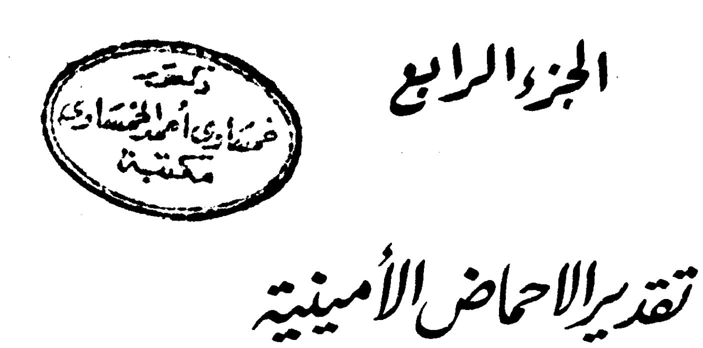
أسس تحليل وتقييم الأعلاف



الجزء الرابع

تقدير الاحماض الأمينية

دكتور
خمساوي أحمد الخمساوي
أستاذ م بجامعة الأزهر



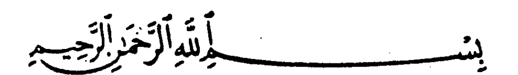
عزبة النخل — القاهرة

الطبعة الأولى ١٩٩٠

رقم الايداع بدار الكتب والوثائق القومية

١٩٩٠ / ٨٤١٣

مقدمة



الحمد لله رب العالمين ، و الصلاة و السلام على سيدنا محمد مدينة العلم و سيد المرسلين ، صلى الله عليه و على اله و سلم ٠

و بعد ٠٠٠

فهذا هو الجزء الرابع من كتاب " اسس تحليل و تقييم الاعلاف " و هو الجزء المخصص لطرق تقدير الاحماض الامينية ، و كان قد سبق ان نوهنا فى مقدمة الجزء الاول الى ان الجزء الرابع من الكتاب سيتناول طرق تقدير الاحماض الامينية و العناصر الدقيقة ، الا ان حجم هذا الجزء لم يتسع للمركبات الدقيقة لذلك سوف نفرد لها جزءان آخران من هذا الكتاب احدهما : لطرق تقدير الفيتامينات و المركبات العضوية الدقيقة الاخرى ، و الاخر لطرق تقدير العناصر المعدنية ٠

و قد كان منهجى فى هذا الجزء : ان افردت فصلا مطولا عن الاحماض الامينية للتعرف عليها بالقدر الذى يساعد على ضبط طريقة تقديرها و اختيار انسب الطرق لذلك ٠

و قد افردت فصلا عن طريقة اعداد العينات و هضمها ، ثم فصلا عن الطريقة الميكروبيولوجية ، و عندما تعرضنا للتقدير بالطرق الكروماتوجرافية فقد اوجزنا

بعض المعلومات المفيدة عن طرق التحليل الكروماتوجرافى ليسهل تتبع تكييفهـا لتحليل الاحماض الامينية ، و بالنسبة لاجهزة (AAA) فقد حرصت على توضيح احد نظم هذا النوع من الاجهزة بالتفصيل المطول معتمدا المعلومات و المقاياسات المعمول بها فعلا و ذلك لاضع تحت يد الباحث معطيات هذا النظام الجديد على اسلوب التحليل الروتينى ، و راعيت ان اكثر من الصور و الرسوم التوضيحية لامكان تصور اجزاء هذا الجهاز .

و فى النهاية آمل ان اكون بهذا الجزء قد وضعت بين يدى الباحثين و طلاب الدراسات العليا ما يمكنهم من خوض مجال التحليل للاحماض الامينية ، حيث اصبحت الان من اهم مشاكل التغذية على البروتين ، و اصبحت عملية تقديرها ضرورة فى كثير من العلائق و تحت العديد من الظروف سواء العلمية او التجارية .

و لعل السبب فى عدم اقدام الباحثين على هذه النوعية من التحليلات راجع الى انهم يهابونها و يخشون من تبعة الخطأ فيها و طول و تعقيد طريقة التحليل فيها ، و لعل هذا الكتاب يكون فاتحة خير لهم و يساعدهم فى خوض هذا الغمار ، و الله ولى التوفيق !!!

الخمساوى

الفصل الأول

الاحماض الامينية

AMINO ACIDS

الاحماض الامينية هى الوحدات البنائية للبروتين و هى مركبات عضوية تحتوى على مجموعة كربوكسيل على الاقل و على مجموعة امين على الاقل ، و من هنا جاء اسمها " احماضا " و " امينية " .

و يمكن اعتبار الاحماض الامينية مشتقة من الا حماض الدهنية باستبدال ذرة الهيدروجين من مجاميع الاكيل بمجموعة امينو ($-NH_2$) .

$$R-\underset{H}{\overset{H}{C}}-COOH \longrightarrow R-\underset{NH_2}{\overset{H}{C}}-COOH$$

Fatty acid — Amino acid

حمض دهنى — حمض امينى

فاذا استبدلت ذرة الهيدروجين من مجموعة الاكيل لحمض الخليك بمجموعة أمين تنتج حمض " امينو الخليك Amino acetic acid " و الذى يعرف بـ " الجلايسين Glycine " .

$$H-\overset{H}{\underset{H}{C}}-COOH \longrightarrow H-\overset{H}{\underset{NH_2}{C}}-COOH$$

حمض الخليك — حمض اميتو الخليك Glycine

واما فى الاحماض الدهنية التى تحتوى على اكثر من ذرتى كربون فانه ينتج عنها احماضا متشابهة تشابها وضعيا بالنسبة لوضع مجموعة الامين فى الجزئ ، او بمعنى اصح حسب موضع مجموعة الامين بالنسبة لمجموعة الكربوكسيل فى الحمض الامينى و تنتج احماضا امينية (الفا ـ بيتا ـ جاما .... الخ) .

$$\begin{array}{ccccccccccc} \ldots\delta & & \gamma & & \beta & & \alpha & & \\ R & - & C & - & C & - & C & - & C & - & COOH \\ \ldots & & 5 & & 4 & & 3 & & 2 & & 1 \end{array}$$

وقد يسمى الحمض الامينى تبعا لترقيم ذرات الكربون فى الجزئ ابتداء من ذرة الكربون فى مجموعة الكربوكسيل كما فى الشكل السابق .

وقد تم الان فصل اكثر من ٢٠٠ حمضا امينيا مختلفا من النباتات والحيوانات والكائنات الدقيقة ، و لكن لم يعثر الا على اقل من ثلاثين حمضا منها فى تركيب البروتينات ، اما الباقى فيوجد فى حالة حرة ، واتفق على تقسيم الاحماض الامينية التى توجد فى البروتينات الى نوعين :

تلك التى توجد بصفة مستديمة فى معظم البروتينات وعددها ٢١ حمضا ، والاخرى التى توجد احيانا فى نوع واحد من البروتينات ، وهى غير منتشرة انتشارا واسعا وهى ايضا على نوعين : ما وجد منها فى بروتين واحد فى

الحيوانات او النباتات الراقية ، وما وجد منها فى بناء بروتين الاحياء الدقيقة ولم يوجد فى بروتينات الحيوانات الراقية وعدد ماينتمى الى هذين النوعين الاخيرين لا يتعدى تسعة احماض.

وجميع الاحماض الامينية الفسيولوجية باستثناء البعض منها (مثل البرولين والهيدروكسى برولين) عبارة عن احماض الفا امينية ، وعلى ذلك يكون الرمـــز العام لها

```
       H    carbon
       |
   R - C - COOH
       |
       NH2
```

الصفات الفيزيقية للأحماض الأمينية.

PYSTICAL CHARACTERISTICS

<u>اللـــــــون</u> : مواد صلبة ، عديمة اللون ، او بيضاء ، ويمكن الحصول عليها فى صورة متبلورة .

<u>نقطة الانصهار</u> : ذات نقطة انصهار مرتفعة تزيد غالبا عن ٢٠٠ مْ وتصل احيانا او تـزيد عن ٣٠٠ مْ .

<u>الذوبان فى الماء</u> : سهلة الذوبان فى المـاء ، فيما عدا التيروزين فذوبانه شحيح جدا فى الماء البارد ولكنه يذوب فى الماء الدافئ اكثر ، والسستين وهو عديم الذوبان تقريبا فى الماء .

<u>الذوبان فى المذيبات</u>: معظمها عديمة الذوبان فى الايثانول او الاثير

جدول (١) : اسماء الاحماض الامينية الشائعة الـ(٢١) المنتشرة فى بروتينات الحيوانات و النباتات الراقية

م	الاسم العربى	الاسم الانجليزى	الرمز المختصر	الوزن الجزيئى
١	الجلايسين	Glycine	Gly	٧٥
٢	الالانين	Alanine	Ala	٨٩
٣	الفالين	Valine	Val	١١٧
٤	الليوسين	Leucine	Leu	١٣١
٥	الايزوليوسين	Isoleucine	Ile	١٣١
٦	السيرين	Serine	Ser	١٠٥
٧	الثريونين	Thrionine	Thr	١١٩
٨	الميثايونين	Methionine	Met	١٤٩
٩	السستائين	Cysteine	Cys	١٢١
١٠	السستين	Cystine	Cyss	٢٠٤
١١	الاسبارتيك	Asparatic acid	Asp	١٣٣
١٢	الاسبراجين	Asparagine	Asn	١٣٢
١٣	الجلوتاميك	Glutamic acid	Glu	١٤٧
١٤	الجلوتامين	Glutamine	Gln	١٤٦
١٥	اللايسين	Lysine	Lys	١٤٦
١٦	الارجنين	Arginine	Arg	١٧٤
١٧	الهستدين	Histidine	His	١٥٤
١٨	التريتوفان	Tryptophan	Try	٢٠٤
١٩	الفينيل الانين	Phenylalanine	Phe	١٦٥
٢٠	التيروزين	Tyrosine	Tyr	١٨١
٢١	البرولين	Proline	Pro	١١٥

جدول : ٢ اسماء الاحماض الامينية غير الشائعة و لكنها تدخل فى تركيب بروتين واحـد على الاقل

م	اسم الحمض العربـــى	الاســم الانجليزى	البروتين التى وجدت فيـــه
١	٣ـ هيدروكسى برولين	3-Hydroxyproline	Collagin
٢	٤ ـ هيدروكسى برولين	4-Hydroxyproline	
٣	هيدروكسى لايســـين	Hydroxylysine	
٤	بيتا هيدروكسى لايســين	β- hydroxylysine	
٥	ثنائى يوديد التيروزيــن	3,5-diiodotyrosine	Thyrprotein
٦	الثيروكســــــين	Thyroxine	
٧	ثلاثى يوديد الثيروكسين	3,5,$\bar{3}$ - Triiodothyroxine	
٨	الفا امينوايزوبيوتاريك	α - amino benzoic acid	

الذوبان فى الاحماض و القلويات : تذوب فى الاحماض و القواعد المعدنية المخففة وتكون املاحـــا

الترسـيب : يمكن ترسيبها بواسطة الكحول ، و لا يمكن ترسيبها بالمحاليل المشبعة لكبريتات الامونيوم او ملح الطعام ، و بذلك يمكن تميزها عـن البروتينـــات .

الطعم : بعض الاحماض الامينيـة ذات طعم حلو مثل :
الجلايسين ، الالانين ، الفالين ، البرولين ، السيرين

التريتوفان ، الهستدين ٠

وبعضها عديم الطعـم ، مثل : الليوسـين

وبعضها ذات طعم مـر ، مثل : الايزوليوسين ، الارجنيـن

** الملح الصوديومى لحمض الجلوتاميك Sodium glutamate ذو طعم ونكهة ذكية ولذلك يستخدم كمكسب للطعم والنكهة للاطعمة ، ويصنـع على نطاق واسع لهذا الغرض ٠

خاصية الانفوتيرية

والاحماض الامينية " الكتروليتات امفيوتيرية " لاحتوائها على مجاميع امينـو قاعدية وكربوكسيل حامضية ، وتعرف عادة باسم " الامفوتيرات " Ampholytes والاحماض الامينية احادية الكربوكسيل احادية الامين تكون فى المحاليل المائيـة ايونات ثنائية القطب Dipolar او (Zwitterion) تحمل شحنتين فى نفس الوقت ٠

$$NH_2-\underset{R}{CH}-COOH \rightleftharpoons \overset{+}{NH_3}-\underset{R}{CH}-COO^-$$

وينتج الايون ثنائى القطب من انتقال بروتون (H) من مجموعة الكربوكسيل الى مجموعة الامين ، واضافة ايون الايدروجين الى الجزىء المتعادل كهربيا يضعف تأين مجموعة الكربوكسيل ويصبح الجزىء ذو شحنة موجبة خالصة بالنسبة لاحتوائـه على بروتون بجانب الايون ثنائى القطب ٠

$$\overset{+}{N}H_3-\underset{R}{CH}-CO\bar{O} \quad + \quad \overset{+}{H} \qquad \overset{+}{N}H_3-\underset{R}{CH}-COOH$$

و بالمثل يلاحظ عند اضافة قاعدة الى ايون ثنائى القطب فانها تعمل على ازالة بروتون ايون الامين و بذا يصبح الجزئ سالب الشحنة ٠

$$\overset{+}{N}H_3-\underset{R}{CH}-CO\bar{O} \quad + \quad O\bar{H} \qquad NH_2-\underset{R}{CH}-CO\bar{O}$$

و نجد ان الاحماض الامينية التى يكافئ فى جزيئاتها عدد المجاميع الحامضية و القاعدية " اى الاحماض احادية الكربوكسيل احادية الامين " ان ميل مجموعة الكربوكسيل الى فقد البروتون يكون اكبر من ميل مجموعة الامين لاستقباله – و بالتالى فان تركيز الايون الهيدروجينى للمحلول يكون اعلى من تركيز ايون الايدروجين للماء (اى pH اقل من ٧) انظر جدول ٣ ، و لكى يعاد توازن توزيع الشحنات الموجبة و السالبة فى جزئ الحمض الامينى فانه لابد من اضافة قدر يسير من ايونات الهيدروجين و ذلك لطمس الشحنات السالبة ٠

نقطة التعادل الكهربى ISOELECTRIC POINT

و يحسن التعبير عن الاحماض الامينية المتعادلة كهربيا بانها املاح كاملة التأين و متعادلة داخليا عن طريق مجاميع الامين و الكربوكسيل الداخلة فى تركيب الجزئ ، و لكن يجب ملاحظة انه تحت ظروف التعادل الكهربى تكون الاحماض الامينية المتأينة فى حالة تتساوى فيها الشحنات الموجبة و الشحنات السالبة ، و بذا

جدول : ٣ ثابت التأين للاحماض الامينية الشائعة و درجة (pH) لها فى ٢٥°م

اسم الحمض الامينى	ثابت التأين لمجموعة الكربوكسيل pK_1	ثابت التأين لمجموعة الامين pK_2	ثابت التأين للاخرى pK_3	رقم (pH)
الجلايسين	٢ر٣٥	٩ر٧٨		٦ر١
الالانين	٢ر٣٤	٩ر٨٧		٦ر١
السيرين	٢ر٢١	٩ر١٥		٥ر٧
السستائين (٣٠°م)	١ر٩٦	٨ر١٨	١٠ر٢٨	٥ر١
السستين (٣٠°م)	١ر٠٠	١ر٧٠	٧ر٤٨ و ٩ر٠٢	٥ر٦
الميثايونين	٢ر٢٨	٩ر٢١		٥ر٨
الفالين	٢ر٣٢	٩ر٦٠		٦ر٠
الليوسين	٢ر٣٦	٩ر٦٠		٦ر٠
الايزوليوسين	٢ر٣٦	٩ر٦٨		٦ر٠
التيروزين	٢ر٢٠	٩ر١٠	١٠ر١	٥ر٧
الفينيل الانين	٢ر٥٨	٩ر٢٤		٥ر٩
التريبتوفان	٢ر٣٨	٩ر٣٩		٥ر٩
البرولين	٢ر٠٠	١٠ر٦٠		٦ر٤
الجلوتاميك	٢ر١٩	٤ر٢٨	٩ر٦٦	٣ر٢
الاسبارتيك	٢ر٠٩	٣ر٨٧	٩ر٨٢	٣ر٠
الهستدين	١ر٧٧	٦ر١٠	٩ر١٨	٧ر٦
اللايسين	٢ر١٨	٨ر٩٥	١٠ر٥٣	٩ر٧
الارجينين	٢ر٠٢	٩ر٠٤	١٢ر٤٨	١٠ر٨

تظل الايونات ثابتة لا تتحرك فى المجال الكهربى ، و بذا لا يكون لها اى شحنة ظاهرة فيكون الجزئ متعادلا كهربيا حين تتساوى الشحنات الموجبة و الشحنات السالبة ، و تعرف هذه الحالة بنقطة التعادل الكهربى (Isoelectric point)

القطبية

نظرا لان الاحماض الامينية تحتوى على سلسلة جانبية بخلاف مجموعتى الامين والكربوكسيل الرئيسيتين فى الحمض فان هذه السلسلة قد تكون محتوية على مجموعات تحوى شحنات كهربية ، و تسمى السلسلة فى هذه الحالة " قطبيــــــة " (Hydrophilic او polar) و يسمى الحمض الذى يحتويها حمضـــا قطبيـــا ، و قد لا تحتوى على اى مجموعات و تسمى سلسلة " غير قطبيـــة " (Lipophilic او Non polar) و يسمى الحمض الذى يحتويها حمضا غير قطبى ، كما ان الاحماض القطبية السلسلة تنقسم الى ثلاثة اقســـام تبعا لنوع الشحنات السائدة فى ايونات السلسلة الجانبية هى :

السلسلة المتعادلة : اى التى تحتوى على ايونات سالبة و اخرى موجبة متساوية فتعادل بعضهـا بعضـا

السلسلة الكاتيونيـة : و هى التى تحتوى على ايونات موجبة سـائدة

السلسلة الانيونية : و هى التى تحتوى على ايونات سالبة سائدة

والجدول (٤) يوضـح ذلك .

جدول (٤) : توزيع الاحماض الامينية الشائعة حسب قطبيتها

احماض غير قطبية	احماض قطبية		
	متعادلة	كاتيونية	انيونية
الالانين	السيرين	الهستدين	الاسبارتيك
الايزوليوسين	الثريونين	الارجنين	الجلوتاميك
الليوسين	السستين		
الميثايونين	السستائين		
الفينيل الانين	التيروزين		
البرولين	الاسبارجين		
التريبتوفان	الجلوتامين		
الفالين	الجلايسين *		
الجلايسين	الميثانيونين *		
	التريبتوفان *		

* بعض الاراء ترى انها حمضا غير قطبى و البعض الاخر يرى انها قطبية متعادلة

تقسيم الاحماض الامينية تبعاً لعدد مجموعات الامين والكربوكسيل

تقسم الاحماض الامينية الى ثلاثة اقسام :

الاول : ويشمل الاحماض الامينية المحتوية على عدد متساوى من مجموعات الامين والكربوكسيل وتسمى الاحماض الطبيعية او المتعادلة وهى قسمان ايضا :

(١) الاحماض احادية الامين احادية الكربوكسيل : ويتبعها معظم الاحماض الشائعة

(٢) الاحماض ثنائية الامين ثنائية الكربوكسيل : ويتبعها اميدين هما الاسبارجين والجلوتامين

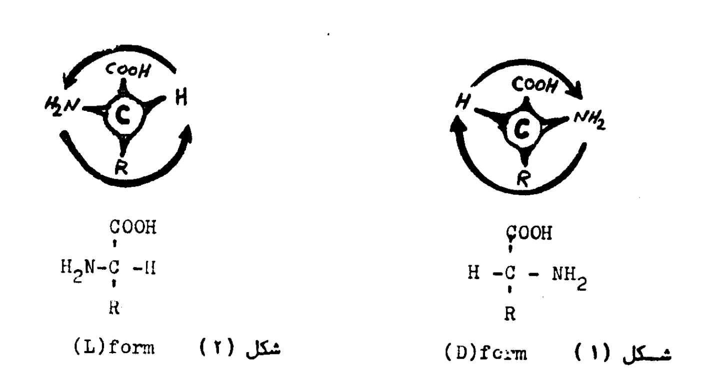
الثانى : ويشمل الاحماض المحتوية على عدد من مجموعات الامين اكثر من مجموعات الكربوكسيل وتسمى ايضا احماضا قاعدية وتشمل ثلاثة احماض هما اللايسين والارجنين والهستدين

الثالث : ويشمل الاحماض المحتوية على عدد من مجموعات الكربوكسيل اكثر من مجموعات الامين ، وتسمى احماضا حامضية وتشمل حامضان هما : الاسبارتيك والجلوتاميك .

الدوران النوعى SPECIFIC ROTATION

وتعتبر الصفة الهامة للاحماض الامينية البروتينية هى فاعليتها الضوئية (Optical activity) وباستثناء الجلايسين فان كل هذه الاحماض

الامينية الـ (٢٠) الباقية لها نشاطا ضوئيا اى لها القدرة على دوران الضوء المستقطب المار بها ، ويرجع ذلك لوجود ذرة كربون واحدة او اكثر توجد عليها مجموعات كيميائية فى اوضاع غير متماثلة ، وفى اغلب الاحيان تكون قيمة الدوران النوعى Specific activity بين ٢٠° — ٣٠° يساراً او يميناً ، واحيانا تكون اكبر او اقل من ذلك ، ومن ضمن الاحماض الامينية البروتينية ذات الفاعلية (النشاط) الضوئى تتميز عشرة منها بالدوران اليمينى (+) وثمانية بالدوران اليسارى (—) الا ان جميعها تقريبا تتبع التماثل البنائى (L) وهى تلك البنية التى تكون روابط التكافؤ فى النموذج الرباعى السطوح لذرة الكربون غير المتماثلة موضحة فى الشكل (١) ، (٢) .



(L)form شكل (٢)

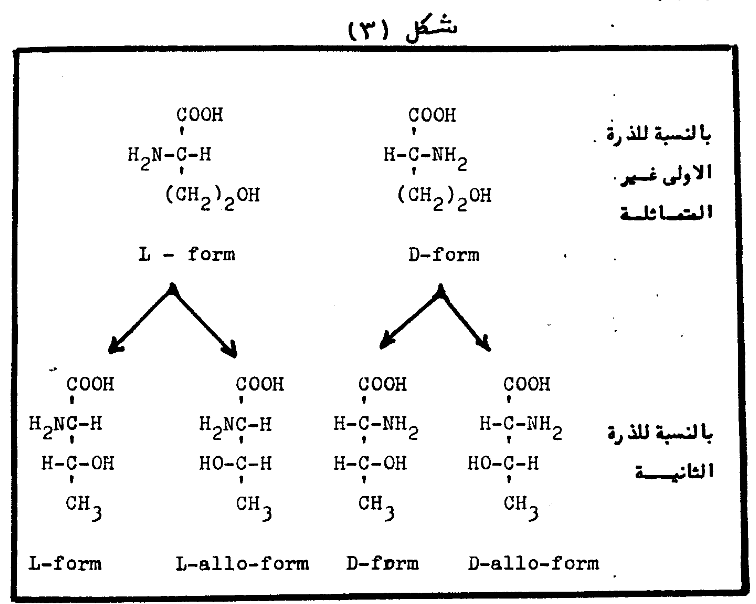
(D)form شكل (١)

وفى بعض الاحيان وجدت احماض امينية تدخل فى بناء بروتينات فى المضادات الحيوية فى البكتريا او بعض الاحياء الدقيقة تكون من النوع (D) .

ويوجد اربعة احماض امينية هى الثريونين والايزوليوسين والهيدروكسى برولين والهيدروكسى لايسين ، لها ذرتان من الكربون غير متماثلة ، وعليه يكون لكل منها

اربعة ايزوميرات مختلفة ، وتسمى الصور التى يكون وضع التماثل فيها للذرة الثانية منها مشابه لتماثل الذرة الاولى بالصورة (-Allo) . وبناء عليه يكون للثريونين مثـــلا :

شكل (٣)



وعند تحضير الاحماض الامينية كيميائيا فى المعمل نحصل على مركب لا يؤثر على الضوء المستقطب ويسمى راسيمات (rasemate) وهو عبارة عن مخلوط من كل المتشابهات الضوئية البنائية للحمض الامينى ولذلك توضع امام اسمه عـــلامة (± DL) .

وتعتبر الصورة (-L) هى الصورة الفعالة غذائيا نظرا لان جميع البروتينات المخلقة فى اجسام الكائنات الراقية تحتوى على احماض الفا امينية على الصورة (L)

الا انه عند اختبار التأثير الغذائى للراسيمات (الصور المخلقة صناعيا) وجد انها تتفاوت فى التأثير الغذائى بالنسبة للصورة الطبيعية (L-) ٠

فمنها ما كانت قيمته الغذائية ٥٠ ٪ من الصورة (L-) ومعنى ذلك ان الصورة (D+) تكون غير فعالة غذائيا اى تساوى صفر ، كما فى اللايسين ولذلك يجب ان يضاف على صورة (L) فى العلائق ، واذا اضيفت على الصورة (DL±) فيجب مضاعفة الكمية المضافة عن الاحتياجات ٠

ومنها ما كانت قيمته الغذائية ١٠٠ ٪ من الصورة (L-) ومعنى ذلك ان الصورة (D +) فعالة غذائيا مثل الصورة (L-) تماما ، ومثال ذلك : الميثايونين وهو يضاف الى العلائق فى اى صورة كانت ، وتعتبر الراسيمات الخلقة صناعيا منه (DL±) ذات فاعلية غذائية كاملة ، ومنها ما كانت قيمته بين هذا وذاك ٠

تواجد الاحماض الأمينية فى البناء البروتينى٠

سبق ان ذكرنا ان عدد الاحماض الامينية التى امكن عزلها ودراستها تزيد عن ٢٠٠ حمضا الا ان عددا قليلا منها هو الذى امكن اثبات انه يدخل فى بناء البروتينـــات ويمكن القول انه قد اصبح من المقطوع به الان ان الاحماض الامينية التى ثبت انهــا توجد فى بناء البروتين سواء فى البروتين الذى تبنيه الكائنات الدقيقة او الحيوانات والنباتات الراقية ٠

وفى هذا الكتاب سوف نصطلح على تسمية الاحماض الامينية التى تدخل فى بناء البروتين او تنتج عن تحليله فى الجسم اثناء التمثيل الغذائى او اثناء ايضــه

او يكون لها وظيفة فسيولوجية بشكل او باخر ب " الاحماض الامينية الفسيولوجية " " Physiological amino acids " اما الاحماض التى قطع بانها هى التى تدخل فى بناء البروتينات ب " الاحماض الامينية البروتينية " " Proteinic amino acids " وعددها ٢٨ حمضا ، واما الاحماض الامينية التى لا تبنى فى بروتينات الكائنات الراقية اى بعد استثناء الاحماض التى تبنى فى الاحياء الدقيقة فقط فنسميها ب " الاحماض الامينية البروتينية الحقيقية True proteinic amino acids " ويشمح منها ٢١ حمضا امينيا حيث ان الباقين لا يوجدون الا فى بروتينات خاصة قليلة الانتشار ولذلك تسمى هذه البروتينات ال (٢١) ب " البروتينات الشائعة " وهى التى نركز دراستنا هنا عليها والشكل التالى (شكل ٥) يوضح ذلك ٠

تواجدها فى البروتينات المختلفة

فى الوقت الحالى وبعد ان اصبح من المعروف تفصيلا التركيب الوصفى والكمى للاحماض الامينية لعدة عشرات من البروتينات فانه قد سمحت دراستها لاقرار بعض القواعد عن تواجد تلك الاحماض الامينية فى البروتينات ، فمثلا :

١ اللوسين واللايسين والاسبارتيك والجلوتاميك توجد فى البروتينات بكميات كبيرة (١٠ — ١٥ ٪) لكل منها ، وعلى العكس من ذلك فان نصيب التريتوفان والسستائين والسستين والهستدين قليلا ما يزيد عن ١,٥ — ٢ ٪) وتتراوح كمية بقية الاحماض الامينية عادة بين القيم السابقة ٠

٢ يكون دائما فى البروتينات (باستثناء البيسين) الايزوليوسين اقل من اللوسين وهما حمضان لهما سلسلة اليفاتية غير قطبية مكونة من ست ذرات كربون ،وايضا

الاحماض الامينيـــــــة (اكثر من ٢٠٠ حمضـــا)

الاحماض الامينية الفسيولوجية (اكثر من ٤١ حمضـــا)

الاحماض الامينية البروتينية (الفا) حوالى ٢٨ حمضا

الاحماض الامينية البروتينية الحقيقية (الفا – ل)
(٢٣ – ٢٥ حمضـــا)

الاحماض الامينية البروتينية الشائعة (٢١ حمضا)

الاحماض الامينية الضروريـــة (٨ – ١٦ حمضا)

الاحماض الامينيـــة المحددة
(٦ أحماض)

الاحماض الامينية الحرجة
(٥ أحماض)
يجب أن تضبط فى العلائق

كل حمض يحتوى على مجموعة أمين ومجموعة كربوكسيل على الأقل

كل حمض أمينى له دور وظيفى فى الكائنات الحية

الاحماض التى تدخل فى بناء البروتين وهى صيغ الفا

التى تدخل فى بناء بروتينات حقيقية فى الكائنات الراقية

المنتشرة فى معظم البروتينات فى الطبيعة

يجب توفرها فى الغذاء

التى تنقص فى

شـكل (٤) اقسام وتسمية الاحماض الامينيـــة

و على نفس النسق يكون الهستدين اقل من الارجنين و هما حمضان قاعديان ، الثريونيـــن اقل من الســيرين و هما حمضان هيدروكسيليان ، و الاسباتيك اقــل من الجلوتاميك و هما حمضان حامضيان ٠

٣ بعض البروتينات تتميز بوجود احماض امينية متخصصة تماما ، فمثلا : بروتيــن (السالمين Salmin) و هو بروتامين لقاح ذكور سمك السالمون يتــوكن من ٨٥٫٢ ٪ ارجنين ، ٩٫١ ٪ سيرين و يحتوى ايضا على كميات كبيرة من الالانين و الجلايسين و الفالين و الايزوليوسين و البرولين ٠

٤ و يحتوى تيروزين حرير القز على ٢٩٫٧٪ الانين ، ٤٣٫٦ ٪ جلايسين ، ١٢٫٨ ٪ تيروزين ، ١٦٫٢٪ سيرين ، بينما تكون النسبة المئوية لباقى الاحماض الامينية ضئيلة ٠

٥ بروتين زايين الذرة لا يحتوى على الجلايسين او اللايسين

٦ الجيلاتين و الكولاجين و الاليســتين لا تحتوى على تربتوفـان

٧ الفوسفوتين لا يحتوى على الســـستين

٨ الهيموجلوبين لا يحتوى على ايزوليوسـين

٩ الانســلوين لا يحتوى على الميثانوين و لا التريبتوفان

١٠ هرمون النمو فى الغدة النخاميـــة لا يحتوى على ميثايونين و لا ســستائين و لا سستين ٠ و فيما يلى نكتب نبذة مختصــرة عن كل حمض من الاحماض الامينيـــة الواحـد و عشـرون الشـائعة ٠

١- الجلايسين

GLYCINE (Gly)

Glycocoll — CH_2-COOH

aminoacetic acid — NH_2

Mol. = 75

و هو مشتق من حمض الخليك باستبدال ذرة ايدروجين بمجموعة امين ٠
و هو مادة بيضاء متبلوره بلوراتها منشورية شفافة رباعية الاوجه شكل (٥) حلو الطعم
اكتشفه براكونو سنة ١٨٢٠ فى الجيلاتين ، وكان اول الاحماض الامينية اكتشافا
و سماه الجلايسين اى " الحلو " و هو سهل الذوبان فى الماء ٠



GLYCINE.

شكل (٥)
بلورات الجلايسين

و الجلايسين لا يحتوى على سلسلة جانبية حيث تحل محلها ذرة هيدروجين و لذا يعتبره البعض من الاحماض القطبية على اساس فعل ذرة الهيدروجين هذه و البعض الاخر على انه حمضا غير قطبى على اساس عدم وجود سلسلة جانبية فيه ، كما انه لا يحتوى على ذرة كربون غير متماثلة فليس له صور ايزوميرية و ليس له نشاطا ضوئيـــا ٠

و تفاعل الجلايسين متعادل و يعطى (pH ٦ر١) و يعطى لونا بنفسجيا مائل الى الحمرة مع النتهيدرين ، و يخلو زايين الذرة من الجلايسين فى حين انــه يوجــد بنسبة عالية جدا ٤٤ ٪ من فيبرين الحرير لدودة القز ، و يوجد بنسبة عالية فى الكولاجين و الجيلاتين و الالاستــين ٠

٢- الالانين ALANINE

$CH_3-CH(NH_2)-COOH$

ALANINE (Ala)
α- aminopropionic acid
(2-amino propanoic acid)
Mol. = 89

اكتشفه فييل سنة ١٨٨١ فى فيبرين الحرير الطبيعى و هو سريع الذوبان فى الماء حلو الطعم و هو مشتق من حمض البروبيونيك و هو يحتوى على سلسلة جانبية من مجموعة ميثيل واحدة و لذلك هو حمض غير قطبى متعادل التفاعـــل (pH ٦ر١) و دورانه النوعى (+ ٧ر٢°) و الصــورة النشطة حيويا الداخلة فى تركيب البروتين هى (L-) و يعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين ،

و يوجد بكمية كبيرة فى الحرير ٢٥ ٠/٠ كما انه مع الجلايسين يكونان فقط سلسلة البولى ببتيدية المكونة للحرير الصناعى (النايلون) المتينة جـدا و يوجـد بكثرة ايضا فى الايلاستين (١٨ ٠/٠) .

٣- الفالين VALINE

VALINE (Val)

α - amino- isovaleric acid

(2,amino-3,methyl-butaric) acid

Mol. = 117

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} > CH-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

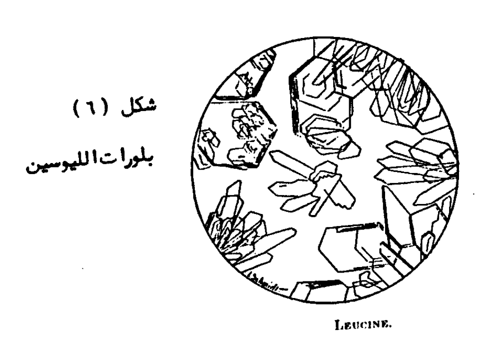
اكتشفه شتيوتسينبيرجى سنة ١٨٧٩ فى الالبيومين و هو يذوب نوعا ما فى الماء و يحتوى الفالين على سلسلة جانبية اليفاتية متفرعة غير قطبية متعادلة (pH = ٦) و دورانه النوعى (— ٦ر٤°) و الصورة النشطة حيويا الصورة (L-) و يعطى لونا بنفسجيا مع النينهيدرين و يخلو الجيلاتين من الفالين مع انه يكثر فى الكازيـن و البومين البيض ، و الفالين من الاحماض الضرورية التى يجب توفرها فى غـذاء الثدييات و الطيـور .

٤- الليوسين　　*LEUCINE*

LEUCINE (Leu)
-amino,isocaproic acid
(2-amino,4-methyl -pentonoic)
acid
Mol.= 131

$$\begin{matrix} CH_3 \\ CH_3 \end{matrix} CH_2-CH_2-\underset{NH_2}{CH}-COOH$$

اكتشفه براكونو سنة ١٨٢٠ فى الصوف ، وكان ثانى الاحماض الامينية المعزولة ولونه ابيض ولذلك سماه براكونو اليوسين (اى الابيض) وليس له طعم مميز ، الا ان الصورة (D) ذات طعم حلو ، ويحتوى على سلسلة اليفاتية متفرعة ، وهو غير قطبى سهل الذوبان فى المـاء ، ويتبلور بلورات رقيقة لامعــة كما فى شكل (٦) ، وهو متعادل (pH ٦٫٠) ودورانه النوعى (ــ ٤٫١٠°) .



شكل (٦)
بلورات الليوسين

والصورة النشطة هى (L) وان كان قد اكتشف وجود الصورة (D) منه فى الجراميسيدين د " Garmicidin - D " وفى البولى مايكسين " Polymycin " وفى السركيولين " Circulin " التى تخلقها الاحياء الدقيقة ، وهو يعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين ، والليوسين من الاحماض الامينية الضرورية للثدييات والطيور .

٥- الايزوليوسين ISOLEUCINS

isoLEUCINE (Ile)

β-methyl,β-ethyl, α-amino propionic acid

(2,amino,3-methyl propanoic) acid

MOl. = 131

$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$

اكتشفه ايرليخ سنة ١٩٠٤ فى فيبرين الدم ، ويشبه فى مظهره الليوسين فهو ابيض اللون ذو بلورات رقيقة لامعة تذوب فى الماء بسهولة وذات طعم مر ، ويحتوى على سلسلة غير قطبية وهو متعادل (pH ٦٫٠) ويعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين ، وهو من الاحماض الضرورية للثدييات والطيور .

٦- السيرين SERINE

SERINE (Ser)

β- hydroxy, α-amino propionic acid

(2-amino, β-hydroxy propanoic acid)

Mol. = 105

$$\underset{OH}{CH_2}-\underset{NH_2}{CH}-COOH$$

اكتشفه كرامير سنة ١٨٦٣ فى لب الحرير ، يذوب فى الماء بسهوله و طعمه حلو و هو من الاحماض ذات السلسلة الاليفاتية المستقيمة القطبية نظرا لوجود مجموعة الهيدروكسيل على ذرة الكربون الثالثة ، و هو متعادل (pH ٥,٧) و دورانه النوعى (٠ ـ ٦,٨°) و الصورة النشطة حيويا هى الصورة (L) • و يعطى لونا بنفسجيا مع النينهيدرين ، و هذا الحمض لا يخلق الا من الجلايسين •

٧- الثريونين THREONINE

THRIONINE (Thr)

β-hydroxy, α-amino butyric acid

(2-amino, 3-hydroxy butanoic acid)

Mol. = 119

$$CH_3 - \underset{OH}{CH} - \underset{NH_2}{CH} - COOH$$

* اكتشفه زيلينسكى ١٩٢١ فى كبراتين القرن
* يذوب فى المـاء
* ذو سلسلة اليفاتية جانبية قطبية لاحتوائه على مجموعة هيدروكسيل على ذرة الكربون رقم ٣
* متعـــادل
* له اربعة صور ايزوميرية لوجود ذرتين غير متماثلتين ، والصورة (L) فقط هى النشطة حيويا
* ويعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين
* وهو من الاحماض الامينية الضرورية للثدييات والطيور ٠

٨- الميثايونين *METHIONINE*

METHIONINE (Met)

-methylthio, -amino butyric acid

(2-amino,4-(methylthio)butanoic acid)

Mol. = 149

$$CH_3-S-CH_2-CH_2-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH$$

* اكتشفه ميوليـر سنة ١٩٢٢ فى الكازيـن
* يذوب فى المـاء
* هو من الاحماض المحتوية على الكبريت ، فتحتوى السلسلة الجانبية على ذرة كبريت وهى سلسلة غير قطبيـة
* الميثايونين حمض متعادل (pH ٥,٨)
* يعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين

* للميثايونين صورتان (L & D) الا ان الصورة (L) فقط هى التى تدخل فى بناء البروتين الا انه عند تخلقه صناعيا تتكون الراسيمات الاربعة (± DL) و هى جميعا يمكن الاستفادة منها غذائيا فى جسم الثدييات و الطيور .
* و هو من الاحماض الضرورية للثدييات و الطيور .

٩- السستائين *CYSTEINE*

CYSTEINE (Cys)

β - thio(α -amino propionic acid

(2-amino,3-mercrapto-propanoic acid)

Mol. = 121

$$\underset{SH}{CH_2} - \underset{NH_2}{CH} - COOH$$

* من الاحماض الكبريتية ، و يحتوى على ذرة كبريت فى السلسلة الجانبية و هى سلسلة قطبية متعادلة و الحمض متعادل (pH ١ر٥)
* و لا يخلق فى الجسم الا من الميثايونين و يقدر كيميائيا على صورة حمض سيستيك " Cystic acid " .
* يعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين
* يذوب فى الماء بسهوله ، و يندر وجوده فى النواتج المحللة بعد الهضم الحمضى القوى

١٠- السستين CYSTINE

CYSTINE (Cyss) " Dicysteine "

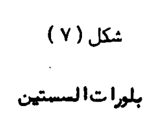
di(β- mercapt-α-amino propionic) acid

(3,3 dithio bis(2-amino propanoic) acid))

Mol. = 240

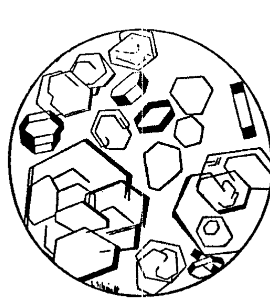
```
CH2-CH-COOH
 '   '
 S   NH2
 '
 S
 '
CH2-CH-COOH
     '
     NH2
```

و هو عبارة عن بلورات منشورية (شكل ٧) لا يذوب فى الماء البارد او الساخن و لا يذوب فى حمض الخليك و يذوب فى الاحماض و القواعد المعدنية القوية ، و يقدر على صورة حمض سستيك Cystic acid و هو عبارة عن جزيئين من السستائين مرتبطين برابطة كبريتية ، و هو يتحلل بسهولة الى سستائين ، و دورانه النوعى (— ٢٢٫٢°) و هو متعادل قطبى (pH ٥٫٦) و يحتوى على مجموعتين امين و مجموعتين ثيول و مجموعتين كربوكسيل ، و يعطى لونا بنفسجيا مع الننهيدرين و يكثر وجوده فى الكيراتين فى الشعر و القرون و الريش، و هو لا يخلق الا من الميثايونين ٠



شكل (٧)

بلورات السستين



CYSTINE.

١١- حمض الاسبارتيك ASPARTIC ACID

ASPARTIC ACID (Asp)
α- aminosuccinic acid
(amino succinic acid)
Mol.= 133

COOH
|
CH- NH_2
|
CH_2
|
COOH

* اكتشفه ريتخا أوزين سنة ١٨٦٨ فى البروتين النباتى
* و هو يذوب فى الماء
* ذو سلسلة قطبية حامضية و هو ذو تأثير حمضى (pH ٣ر٠)
* و يعطى لونا بنفسجيا مائل الى الزرقة مع النينهيدرين ، ودورانه النوعى (+ ٦°) والصورة (L) هى النشطة حيويا فى بناء البروتين

١٢- الاسبارجين ASPARAGINE

ASPARGINE (Asn)
2-aminosucciniamic acid
Mol.= 132

COOH
|
$CH-NH_2$
|
CH_2
|
$O=C-NH_2$

* سهل الذوبان فى الماء
* ذو طعم حــــــلو
* ذو سلسلة جانبية اليفاتية قطبية متعادلة
* يعطى لونا برتقاليا مائل الى البنى مع النتهيدرين
* يوجد بكثرة فى البروتينات النباتية
* ذورانه النوعى (ـ ٤ر٥°)

١٣- حمض الجلوتاميك GLUTAMIC ACID

Glutamic acid (Glu)

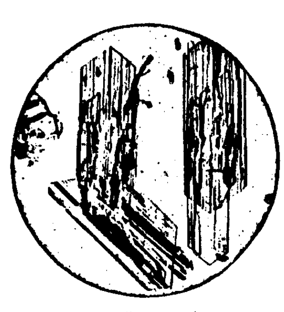
α - aminoglutaric acid

(2-aminoglutaric)acid)

Mol.= 147

```
COOH
 |
CH-NH2
 |
CH2
 |
CH2
 |
COOH
```

* اكتشفه ريتخاأوزين سنة ١٨٦٦ فى البروتين النباتى
* سهل الذوبان فى الماء ذو بلورات مميزة (شكل ٨)
* لاملاحه الصوديومية طعما ونكهة مميزة مقبولة تستخدم تجاريا لتطييب الطعام
* ذو سلسلة جانبية اليفاتية قطبية انيونية وهو حامضى (pH ٢ر٣)
* دورانة النوعى (+ ١٢°)
* تعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين
* معدل تخليقه فى الطيور قليلا ، و تزداد الاحتياجات منه فى الثدييات فى حالة الاصابة بالامراض



شكل (٨)
بلورات حمض الجلوتاميك

* يكثر فى جليادين القمح الذى يحتوى ٤٧ ٪ من الجلوتاميك ، كما يكثر ايضا فى الكازين الذى يحتوى على ٢٣,٣ ٪ منه .

١٤- الجلوتامين GLUTAMINE

GLUTAMINE (Gln)
2-amino glutarami
Mol. = 146

$$\begin{array}{c} COOH \\ | \\ CH-NH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ CH_2 \\ | \\ O=C-NH_2 \end{array}$$

حمض يوجد فى النباتات بكثرة و هو اميد لحمض الجلوتاميك ، متعادل ذو سلسلة قطبية متعادلة و يعطى لونا بنفسجيا مع النثهيدرين .

١٥- اللايسين LYSINE

LYSINE (Lys)

Mol.= 146

α,ε-diaminocaproic acid

(2,6 Diaminohexanoic acid)

$$\underset{NH_2}{CH_2} - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{NH_2}{CH} - COOH$$

* اكتشفه دريكسيل سنة ١٨٨٩ فى الكازين
* و هو سهل الذوبان
* له سلسلة جانبية قطبية كاتيونية يحتوى على مجموعة امين و مجموعة كربوكسيل و هو من الاحماض القاعدية (pH ٩,٧)
* دورانه النوعى يسارى والصورة (L-) هى النشطة حيويا فقط ويخلق منه الان كميات كبيرة على نطاق تجارى و عند تخليق اللايسين توجد منه الراسيمات الاربعة (DL ±) الا ان الصورة (L-) فقط هى الفعالة غذائيا و لذلك تفصل هذه الصورة عن الصور الاخرى و تباع على الصورة (L-lysine) .
* يخلو زايين الذرة من اللايسين ، كما يوجد بقلة فى الجليادين و عموما تعتبر البروتينات النباتية فقيرة فيه عموما باستثناء القليل منها .
* و يعطى لونا بنفسجيا مع النينهيدرين
* و هو من الاحماض الضرورية للثدييات و الطيور .

١٦- الارجينين ARGININE

ARGININE (Arg)

Mol.=174

α -amino, Δ-guanidovaleric acid

(2-amino, 5-guanido valeric acid)

$$H_2N - \overset{\overset{NH}{\|}}{C} - NH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH$$

* اكتشفه جيدين سنة ١٨٩٥ فى كيراتين القرون
* و هو سهل الذوبان
* ذو طعم مــــــر
* و هو سلسلة جانبية قطبية كاتيونية يحتوى على اربعة ذرات ازوت فى الجزئ و هو من الاحماض القاعدية (pH ١٠٫٨) ٠
* يعطى لونا بنفسجيا مع النتهيدرين
* دورانه النوعى (+ ٢٦٫٥°) والصورة (L) هى الفعالة حيويا ٠
* و يكثر فى السالمين الذى يحتوى على ٨٥ ٪ منه و هو بروتين معزول من سبرمات سمك السالمون ٠

١٧- الفينيل الانين

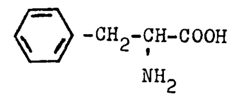
PHENYLATLANINE

PHENYLALANINE (Phe)

β-phenyl, α-amino propionic acid

(2-amino, 3-phenyl propanoic acid)

Mol;= 165



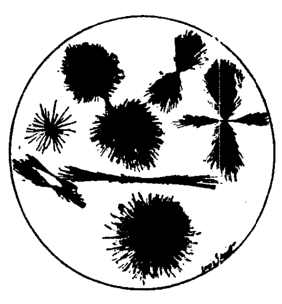
* اكتشفه شولتسي وباربييري سنة ١٨٨٠ في البروتين النباتي •
* سهل الذوبان في المـــاء
* ذو طعــــم حـــلو
* من الاحماض العطرية – يحتوى على سلسلة جانبية غير قطبية تحتوى على حلقة بنزين ، و هو حمض متعادل (pH ٥٫٩)
* دورانه النوعي (– ٣٥٫٣°) و الصورة (L) هي الصورة التي يبنى منها البروتين الا ان الصورة (D) وجدت في بعض البروتينات التي تبنى بواسطة الاحياء الدقيقة مثل : الجيراميسيدين " Garmicidin-S " و الثيروسيدين " Thyrocidine "
* يعطى لونا بنفسجيا رماديـــا مع النتهيدرين
* الفينيل الانين من الاحماض الامينية الضرورية للثدييات و الطيور •

١٨- التيروزين TYROSINE

TYROSINE (Tyr)
-(parahydroxyphenyl) -amino propionic acid
((2-amino,3-(4-hydroxyphenyl) propanoic acid))
Mol.= 181

$HO-C_6H_4-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

* اكتشفه ليبيخ سنة ١٨٤٦ فى الكازين
* له بلورات ابرية (شكل ٩) لا تذوب فى الماء البارد و تذوب فى الماء الساخن ، و يذوب نوعا ما فى الاحماض و القواعد المعدنية المخففة .
* يحتوى على سلسلة جانبية تحتوى على مجموعة بنزين (فهو من الاحماض العطرية) و تحتوى على مجموعة هيدركسيل فهو من الاحماض القطبية المتعادلة (pH ٥ر٧) .
* دورانه النوعى (- ٦ر٨°) .
* يعطى لونا بنفسجيا رماديـــا مع النّنهيدرين
* قليل المحتوى فى الجيلاتيـــن
* و هذا الحمض لا يخلق فى الثدييات و الطيور الا من الفينيل الانين فقط



TYROSINE.

شـكل (٩)

بلورات التيروزين

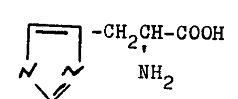
١٩- الهستدين

HISTIDINE (His)

β - imidazol, amino propionic acid

(2-amino,1Himdazole,4-propanoic acid)

Mol. 154



-CH_2CH-COOH

NH_2

- اكتشفه كوسيل وجيدين سنة ١٨٩٦ فى بروتين الحيوان المنوى و فى الكازين
- و هو سهل الذوبان فى الماء حلو الطعم
- ذو سلسلة جانبية تحتوى على حلقة اميدازول ، و هى سلسلة قطبية كاتيونية
- الحمض قاعدى (pH ٧٫٦) .
- دورانة النوعى (— ٣٩٫٧) .
- يعطى لونا بنفسجى رمادى مع النهيدرين
- يكثر الهستدين فى الهيموجلوبين
- الهستدين من الاحماض الامينية الضرورية للثدييات و الطيور .

٢٠- التربتوفان TRYPTOPHAN

TRYPTOPHAN (Try)

β- indole, α -amino-
propionic acid
((2-amino3, (3-indolyl)
propanoic acid))

Mol. 204

(indole ring)$-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

* اكتشفه هوبكينس ، وكولى سنة ١٩٠١ فى الكازين
* يذوب فى المـــاء بصـــعوبـة
* طعمــــه حلــو
* وهو غير قطبى ومتعادل (pH ٥٫٩) .
* دورانه النوعى (– ٣٤) .
* يعطى لونا بنفسجيا رماديا مع النينهيدرين
* يخلو منه بروتين كل من الجيلاتين ، الانسيولين ، الزايين
* وهو من الاحماض الامينية الضرورية للثدييات والطيور .

٢١- البرولين PROLINE

PROLINE (Pro)

α-pyrrolidine carboxylic acid
(2-pyrrolidine carboxylic acid)

Mol.= 110

(pyrrolidine ring, N)$-COOH$

* اكتشفهفيشـــير سنة ١٩٠١ فى الكازين
* سهل الذوبان فى المـــاء ويذوب فى الكحول و الاثير
* ذو طعـم حلـــو
* يحتوى على حلقة بيروليدين و منها اشتق اسمه (برولين) و هو غير قطبى
* حمض متعادل (pH ٦٫٤)
* يعطى لونا اصـــفر مع النتهيدرين ، و ليس بنفسجيا مثل بقية الاحماض الامينية
* الصورة (L) هى الفعالة فى بناء البروتين الا انه وجد له صورة (D) فى بعض البروتينات التى تبنى فى الاحياء الدقيقة (الفطريات) مثل الارجوكورينين • ergocornine •

تقسيم الاحماض الأمينية .

AMINO ACIDS CLASSIFICATION

يكمن تقسيم الاحماض الامينية تقسيمات مختلفة تبعا لاى صفة فيزيقية او كيميائية لها الا ان اكثر تقسيمات الاحماض الامينية شيوعا ما كان تبعا لتركيبها البنائى على النحو التالى :

اولا : الاحماض الامينية ذات السلسلة الاليفاتية :

و تشمل ١٦ حمضا من الاحماض ال (٢١) و تشمل خمسة مجموعات

(١) الاحماض الهيدروكربونية : و هى : الجلايسين — الالانين — الفالين اللوســـين — الايزوليوسين

(٢) الاحماض الكبريتية (المحتوية على الكبريت) : و هى

الميثايونين — الســـستائين — الســـستين

(٣) الاحماض الهيدروكسيلية : وهى : السيرين – الثريونين
(٤) الاحماض الحامضية : وهى : حمض الاسبارتيك واميده الاسبارجين
حمض الجلوتاميك واميده الجلوتامين
(٥) الاحماض القاعدية : وهى : اللايسين و الارجينين

ثانيا : الاحماض الامينية العطرية :

وتشتمل على حمضان هما : الفينيل الانين و التيروزين

ثالثا : الاحماض الحلقية :

وتشتمل على حمضان هما : الهستدين* ، التريبتوفان

رابعا : الاحماض الإمنية :

ويشمل حمضا واحدا هو البرولين

كما تقسم الاحماض الامينية ايضا تبعا لتفاعلها الى :

(١) احماض امينية حامضية : الاسبارتيك والجلوتاميك
(٢) الاحماض الامينية القاعدية : الهستدين – اللايسين – الارجينين
(٣) الاحماض الامينية المتعادلة : بقية الاحماض الستة عشر

---

* الهستدين : يعتبر ايضا من الاحماض القاعدية

و تقسم الاحماض الامينية تبعا لكونها تخلق داخل اجسام الثدييات و الطيور ام لا الى احماض امينية ضرورية , عددها عشرة هى :

الفالين	الليوسين	الايزوليوسين
الثريونين	الميثايونين	اللايسين
الارجينين	الفينيل الانين	الهستدين
التريتوفان		

الاحماض الامينية غير الضرورية و هى الاحدى عشر الباقية

الا انه من الناحية العملية فقد جرى العرف على ضرورة تقدير ستة عشر حمضا هى : العشرة سابقة الذكر و هى العشرة الضرورية و ستة اخرى هى :

الجلايسين : حيث لا يخلق بالقدر الكافى فى الطيور النامية و عالية الانتاج
السيرين : حيث انه لا يخلق الا من الجلايسين
التيروزين : حيث لا يخلق الا من الفينيل الانين
السستين : حيث لا يخلق الا من الميثايونين
الجلوتاميك : حيث لا يخلق بالقدر الكافى فى الحيوانات و الطيور المنتجة
البرولين : حيث لا يخلق فى الجسم بالقدر الكافى

و توجد احماض امينية اخرى لها اهميتها فى التمثيل الغذائى كما انها قد توجد فى عينات التحليل نتيجة لوجودها كمواد حرة مع البروتين او تحللها عن الاحماض الامينية الاخرى ، و فيما يلى : تركيبها البنائى و اسمها الكيميائى و اهميتها :

(١) هيدروكسى لايسين : ويوجد فى الكولاجين فى جميع الثدييات والطيور

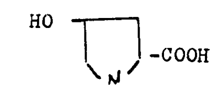
Hydroxylysine (Hyl) 2,6-diamino,5-hydroxyhexanoic acid

$$\underset{NH_2}{CH_2} - \underset{OH}{CH} - CH_2 - CH_2 - \underset{NH_2}{CH} - COOH$$

(٢) ٤ ـ هيدروكسى برولين : ويوجد فى الكولاجين فى جميع الثدييات والطيور

4-hydroxyproline

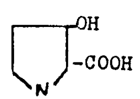
4-hydroxy,2-pyrrolidine carboxylic acid



(٣) ٣ ـ هيدروكسى برولين : يوجد فى الكولاجين فى جميع الثدييات والطيور

3-hydroxyproline

3-hydroxy, 2-pyrrolidine carboxylic acid



(٤) هوموسستائين : وهو حلقة وسطية لتحول الميثايونين الى السستائين

Homocysteine (2-amino,4-mercapto-butanoic acid

$$HS- CH_2 - CH_2 - \underset{NH_2}{CH} - COOH$$

(٥) سستائين سلفونيك : و هو حلقة وسطية لهدم الـ ستائين

Cysteinesulfinic acid

2,amino,3,sulfinopropanoic

acid

$$HO_2S - CH_2 - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH$$

(٦) الهوموسيرين : و هو حلقة وسطية فى التمثيل الغذائى للثريونين و الاسبارتيك و الميثايونين

Homoserine (2-amino,4-hydroxybutanoic)

$$\underset{\underset{OH}{|}}{CH_2} - CH_2 - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH$$

(٧) الاورنســـين : حلقة وسطية للتمثيل الغذائى للارجنين عند تحوله الى السترولين و تخليق اليوريا ، و يوجد بكثرة فى الكبد

Orinithine (2,5-bisaminopentanoic acid

$$\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH_2} - CH_2 - CH_2 - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH$$

(٨) الســترولين : حلقة وسطية لتخليق اليوريا تحلل الارجنين و خروج الامونيا و يوجد بكثرة فى الكبد و فى عصير البطيـخ ٠

Citrulline (2,amino, 5- ureidopentanoic acid

$$H_2N - \overset{\overset{O}{\|}}{C} - NH - CH_2 - CH_2 - CH_2 - \underset{\underset{NH_2}{|}}{CH} - COOH$$

(٩) احادى يوديد التيروزين : حلقة وسطية لتخليق هرمون الثيروكسين (هرمون الغدة الدرقية)

3-monoiodotyrosine

$$HO-C_6H_3(I)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$$

(١٠) ثنائى يوديد التيروزين : حلقة وسطية لتخليق هرمون الثيروكسين

3,5-Diiodotyrosine

$$HO-C_6H_2(I)_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$$

(١١) ثلاثى يوديد الثيروكسين : صورة لهرمون الغـدة الدرقية

5,5,3 Triiodothyroxine

$$HO-C_6H_3(I)-O-C_6H_2(I)_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$$

(١٢) الثيروكسين : هرمون الغدة الدرقية　　Thyroxine

3,5,3,5- tetraiodothyroxine

$$HO-C_6H_2(I)_2-O-C_6H_2(I)_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$$

(١٣) بيتا-الانين : جزء من مرافق الانزيم (أ) " CO - A " وفيتامين البانتوثينيك .

- Alanine (3,amino propanoic acid

$$\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH_2}} - CH_2 - COOH$$

(١٤) التيوريـــن : يوجد فى مركبات الصـــفراء Taurine

2, amino ethylsulfonic acid

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - SO_3H$$

وبالاضافة الى الاحماض السابقة توجد احماض اخرى تنتج عند التحليل المائى للبروتينات ، ومن المتوقع وجودها عند تقدير الاحماض الامينية بالطرق الكروماتوجرافية وهـــــى :

(١) الانثيونيـــن : ويوجد عند تحليل الكيراتين Lanthionine

$$\begin{array}{l} \quad\quad\quad\; NH_2 \\ \quad\quad\quad\;\; | \\ CH_2 - CH - COOH \\ \;| \\ S \quad\quad\; NH_2 \\ \;| \quad\quad\;\; | \\ CH_2 - CH - COOH \end{array}$$

(٢) الهيبوجلايسين : ويوجد عند تحلل بروتين بعض البذور

Hypoglycin A

$$CH_2 = C(CH_2) - CH - CH - CH(NH_2) - COOH$$

(٣) الاليـــن : ويوجد فى النباتات الراقية Allin

$$CH_2 = CH - CH_2 - S(=O) - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$$

(٤) جاما – امينو بيوتاريك : ويوجد فى المخ والنباتات الراقية ويوجد فى انسجة الحيوانات ٠

- aminobutyric acid

$$H_2N - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$$

(٥) الكانافانين : ويوجد فى كسب فول الصويـا Canavanine

$$H_2N - C(=NH) - NH - O - CH_2 - CH_2 - CH(NH_2) - COOH$$

(٦) دوبـــــا : ويوجد فى البذور النابتة لبعض البقوليات

DOPA (Dihydroxyphenyl alanine)

$$HO-C_6H_3(OH)-CH_2-\underset{NH_2}{CH}-COOH$$

و هناك مواد اخرى تنتج عن التحليل (هضم) العينات عند التقدير مثل :

الامونيـا : التى تنتج عن اميدات الاحماض الامينية
ثانى اكسيد الكربون
كبريتيـــد الهيدروجين
اليوريـــــــــــا

الفصل الثانى

هضم العينات وأعدادها للتحليل

DIGESTION AND PREPARATION OF SAMPLE

الهدف من اعداد العينة للتحليل هو احداث تحليل مبدئى لتحويل مواد عضوية معقدة الى اخرى بسيطة مثل : تحلل البروتينات الى احماض امينية حرة او تحويل النشا او السيللوز الى سكريات بسيطة حتى يمكن فصلها و تقديرها ، و ذلك بالطرق التالية :

اولا : الغليان مع احماض او قلويات معدنية قوية سواء تحت الضغط الجوى او تحت ضغط عالى و سواء فى جو الحجرة او بمعزل عن الاكسجين ، و هذه الطريقة هى الاكثر شيوعا فى تحليل البروتينات لتحويلها الى احماض امينية ، و يستخدم فيها واحدة من المواد التالية :

١ ــ حمض الايدروكلوريك ٦ عيارى
٢ ــ حمض الكبريتيك ٨ عيارى

و ذلك بغليان المادة العضوية بما يعادل من ٥ : ١٠ اضعاف وزنها من احد هذين الحمضين لمدة من ٦ ــ ٢٤ ساعة .

٣ ــ حمض الايدروبوديك
٤ ــ حمض الاكساليك

٥ — ايدروكسيد الصوديوم ٥ عيارى
٦ — ايدروكسيد الباريوم المشبع
٧ — خليط من حمضى الفورميك و الهيدركلوريك

ثانيا : المعاملة ببعض احماض السلفونيك طويلة السلسلة
مثل : ١ — Diphenylbenzene sulfonic acid
٢ — Cetylsulfonic acid

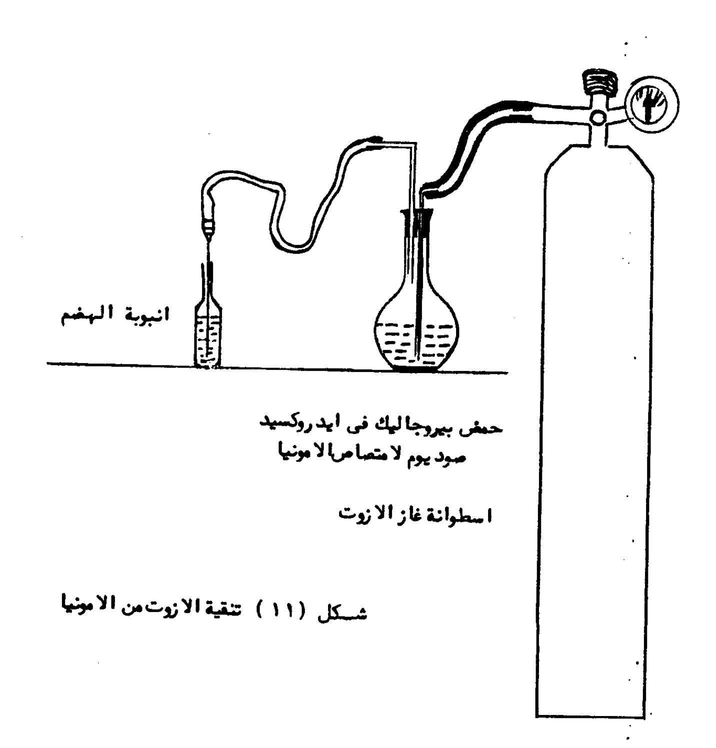
ثالثا : المعاملة بالانزيمات الهاضمة و هى اكثر استخداما مع هضم النشا والدهون ٠

١- الانحلال الحمضى ACID HYDROLYSIS

يضاف حمض ايدروكلوريك ٦ عيارى الى المادة المراد تحللها و التى يجب ان تكون مطحونة طحنا ناعما او مفرومة و متجانسة و ذلك فى انبوبة تحلل خاصة مصنوعة من زجاج يتحمل الضغط و يمكن صهرها بسهولة ، شكل (١٠) ثم يسخن الخليط قليلا لطرد الاكسجين الذائب و يمرر غاز ازوت لاحلاله محل الاكسجين فى الهواء الموجود (اعلى السائل فى الانبوبة) ثم تقفل الانبوبة بصهر الطرف العلوى منها باحكام كما يجب تنقية غاز الازوت من الاوكسجين بامراره فى حمض Pyrogallic acid فى ايدروكسيد الصوديوم ٤ عيارى قبل

شكل (١٠) انبول الهضم

استخدامه لهذا الغرض (شكل ١١) ، و توضع الانبوبة فى فرن على درجة حرارة ١٠٦°م ـ ١١٠°م وتترك حتى يتم الانحلال تماما و تتحول محتويات الانبوبة الى محلول رائق و يستغرق ذلك من ١٨ ـ ١١٤ ساعة ، وعند ذلك تفتح الانبوبة و يبخر حمض الايدروكلوريك تحت ضغط منخفض.



شكل (١١) تنقية الازوت من الامونيا

و فى هذه الطريقة المستخدمة لفصل الروابط الببتيدية فى البروتين و تحرير الاحماض الامينية الحرة تمهيدا لتقديرها مثل الهضم بالاحماض او القلويات او الانزيمات ، و يمكن تتبع انتهاء عملية الهضم بطرق مختلفة منها :

* الكشف عن البروتين فى مخلوط الهضم و ملاحظة اختفائه
* ملاحظة الاذابة حيث ان الاحماض الامينية تذوب فى الماء فى حين لا تذوب بعض البروتينات
* عن طريق الدوران النوعى
* ملاحظة الروابط الببتيدية بامتصاصها للضوء عند طول موجى ٢٣٠ نانومتر
* ملاحظة تكون الاحماض الامينية بالكشف عنها بطريقة وصفية .

و يمكن ايضا ملاحظة تركيز ايون الايدروجين و مدى استهلاك خلال عملية الهضم و ذلك باستخدام اى مقياس مثل اجهزة pH-meters او اوراق خاصة او الادلة .

و عملية تحلل البروتين بالاحماض او القلويات عملية معقدة جدا ، و ذلك لان البروتين عادة ما يحتوى على عدد هائل من الروابط الببتيدية على درجات متفاوتة من النشاط التفاعلى و بين نوعيات متباينة من الاحماض الامينية .

و ينتج عن التحليل الحمضى للبروتين ببتيدات عديدة بينها روابط غالبا ما تكون اكثر مقاومة للتكسير و على ذلك يصبح الناتج خليط معقد من مركبات وسطية كثيرة منها الاحماض الامينية و ببتيدات متباينة الطول و الاحجام ، و يتوقف هذا السلوك على طبيعة البروتين المراد تحليله و قوة الحمض او القلوى المستخدم فى الهضم و درجة الحرارة .

و عند استخدام التحليل الحمضى (الهضم الحمضى) للبروتين تنطلق الامونيا

بسرعة من الروابط الاميدية للاسبراجين و الجلوتامين ، و تتفكك الروابط الببتيدية المحتوية على مجموعة الامين للسيرين و الثريونين بسرعة عن الروابط الببتيدية الاخرى و تنطلق الاحماض الامينية الحرة من اطراف الببتيدات الخارجية و يتوقف التفاعل بعد ذلك على صورة الببتيد الصغير الباقى ، الى ان تصل السلسلة الببتيدية الى تلك المكونة من حمضين فقط (داى ببتيد) ببتيد ثنائى و هى التى تتفك الى حمضين امينيين عند تمام انتهاء التحلل للبروتين الا ان هذه الببتيدات الثنائية غالبا ما تبدى مقاومة عالية للتحلل الحمضى ، و ذلك بسبب التأثير الموجب لمجموعة الامين المجاورة للرابطة الببتيدية .

و تحدث هذه الظاهرة بوضوح مع التحليل بالاحماض المخففة او فى درجات حرارة منخفضة نسبيا حيث تتميز نواتج هذه التفاعلات بوجود كل من الاحماض الامينية و الببتيدات القصيرة فى الناتج النهائى للتحليل .

و عموما عند عملية التحليل الحمضى للبروتين تحدث عمليات تفاعلية اخرى غير تفكك الروابط الببتيدية مثل :

١ — تكون مركبات حلقية (تحلق المركبات)
٢ — تتحد مواضع مجموعات الكربوكسيل على حمضى الاسبارتيك و الجلوتاميك فى الببتيد ما بين الوضع $\alpha > \beta$
٣ — تحلق الجلوتاميك الى بيروليدون كربوكسيلك Pyrrolidone carboxylic acid
٤ — تكسر الجلوتامين و الاسبارجين و التريتوفان حيث ينكسر الحمضان الاولان و تنطلق الامونيا منهما و يكون الثالث معقد طبيعى اسمه الهيومين (Humin)

اما التحلل القلوى للبروتينات فلا يستخدم للتحلل البروتينى بغرض تقدير

جميع الاحماض الامينية ، و ذلك لان عدد كبير منها يتم تكسيره اثناء عملية التحلل و خاصة احماض : السيرين ، الثريونين ، الارجنين ، السستائين ، الا ان التربتوفان يظل ثابتا مع القلويات و بالتالى يمكن تقديره فى نواتج التحلل القلوى للبروتينات .

لبعض الانزيمات القدرة على تحلل البروتين عند درجات حموضة قريبة من التعادل و فى درجة حرارة الغرفة و انطلاق الاحماض الامينية و تعتبر عملية التحلل بالانزيمات و سيلة ممتازة لدراسة الاحماض الامينية فى البروتين و خاصة فى مجال البحوث .
و من هذه الانزيمات المستخدمة :

التريبسين : و هو يحلل الروابط بين مجموعات الكربوكسيل للايسين و الارجنين ، و اذا كانت مجموعة الامين فى الوضع ابسلن من اللايسين انكسرت نتيجة اى تفاعل جانبى فان انزيم التريبسين لا يمكن ان يفك الا الارجنين فقط ، اذ يبدو ان هذه المجموعة الامينية الطرفية ضرورية لتنشيط الانزيم .

الكيموتريبسين : و هو للتحليل المتخصص فى الروابط الببتيدية المتكونة بين المجموعات الكربوكسيلية للتيروزين و الفينيل الانين و التربتوفان و لكنها بطيئة فى تحلل الاحماض الامينية الاخرى .

البيبسين : و هو يحلل بسرعة الروابط الببتيدية المتكونة بين اى من مجموعات الامين او الكربوكسيل للفينيل الانين و التيروزين و الجلوتاميك و السستين و السستائين ، و ان كانت يمكن ان تفكك الروابط الاخرى .

و يوجد نوعان من الانزيمات المحللة للبروتينات امكن الحصول عليهما فى بعض

سلالات Bacillus subtilis وتسمى Sublilisin وتباع تجاريا باسم (نجارس Nagarse) وتستخدم على نطاق واسع تجاريا فى تحلل البروتينات بطريقة وكفاءة تشبه التحلل الحمضى ، ولكن بدون تفاعلات جانبية ، وامكن ايضا الحصول على نوع اخر من الانزيمات من بكتريا اخرى هى Strptomyces griseus واسمه التجارى (بروناز) " Pronase " .

البابيــن : وهو يحلل الروابط الببتيدية المكونة من مجموعة الكربوكسيل للارجنين واللايسين بشكل اسرع بكثير من تكسيرها للروابط الاخرى .

كربوكسى ببتيديز (أ ــ ب) يمكن تحلل سلسلة الببتيدات من الطرف المحتوى على مجموعة الامين الحرة ، والنوع (أ) اقل تخصصا فى حين ان النوع (ب) متخصص فى تكسير النهايــة المحتوية على اللايسين او الارجينين اسرع من غيرها .

ومن اكثر انواع الهضم شيوعا فى هذا المجال الهضم بالاحماض ويجب ان يراعى فى هذا النوع من التحليل ان معظم الاحماض الامينية قد يحدث لها تلف اثنــاء عملية التحلل ولكن هذا التلف يمكن تلافيه تماما بعزل عملية التحلل عن الاكسجــين وذلك بطرد جميع الاكسجين من انبوبة التحليل ، وان كانت عملية التلف ايضــا تختلف من بروتين الى اخر ، وتتأثر بوجود الكربوهيدرات والدهون فى العينة وتتوقف ايضا على نقاوة حمض الهيدروكلوريك المستخدم ، هذا بالاضافة الى بعض الروابط الببتيدية التى تتكون بين الاحماض الاليفاتية الطويلة مثل (الليوسين والايزوليوسين والفالين) تكون اكثر مقاومة للتحلل الحمضى وقد تبقى بدون تحلل الى نهاية التحلل .

ومن الاحماض الاكثر حساسية للتحلل الحمضى ، التريبتوفان اذ يصل التلف فيه الى ١٠٠ ٪ ، وتحت الظروف العادية للتحليل يكون الناتج منه قريبا من الصــــفر

ولذلك يستخدم التحليل القلوى ، وان كان التحليل القلوى يتلف تقريبا جميع الاحماض الامينية الا ان التريبتوفان يظل سليما اثناء التحليل .

الاكسده بحمض البيروفورميك

PERFORMIC ACID HYDROLYSIS

فى الانحلال الحمضى يحدث فقد لبعض الاحماض الامينية الكبريتية ، لذلك لا يعتبر هذا الهضم مناسبا لتقدير احماض الميثايونين والسستائين والسستين ، وباستخدام حمض البيرفورميك " Performic acid " يتحول كل من السستائين والسستين الى السستيك (Cysteic acid) ويتحول الميثايونين الى ميثايونين سلفون " Methionine sulfon " بينما يحدث تلف للتريبتوفان .

ويحضر حمض البيرفورميك باضافة ١ مل من فوق اكسيد الهيدروجين ٣٠٪ الى ٩ مل من حمض الفورميك ٨٨٪ ويترك فى درجة حرارة الجو لمدة ساعة ثم يبرد الى درجة الصفر .

خطوات العمل :

يضاف الى ما يعادل ٢ - ٥ ملجم بروتين او ١ر٠ مل (وتحتوى على ٢٥ نانومول) حوالى ٢ مل من حمض البيرفورميك ، ويترك المخلوط على درجة الصفر لمدة ٤ ساعات .

وفى بعض انواع البروتينات فقد يترك التفاعل لليوم التالى ، وفى النهاية

يوقف التفاعل بالتجميد المفاجئ للمخلوط ثم تسييله ، وتجرى عليه بعد ذلك عمليات الانحلال الاخرى بالطريقة السابقة .

كاربوكسى ميثيل سستائين

S-CARBOXYMETHYLCYSTEINE

وفى هذه الطريقة يمكن تقدير مجموعة Sulphohydryl فى بناء البروتين والتى توجد فى الحمض الامينى السستائين .

سبق ان عرفنا ان الاكسدة بحمض البيرفورميك وان كانت تمكن من تقدير الاحماض الامينية الكبريتية التى تتطاير مع الانحلال الحمضى الا انها تقدر كل من السستائين والسستين على صورة مركب واحد هو حمض السستيك ، وميزة هذه الطريقة انها تحدد هل كل السستائين الموجود فى البروتين يوجد على صورة (S - S) اى سستين ام لا ، او بمعنى اخر تمكن من تقدير كل من السستين والسستائين كل على حده .

ويتم ذلك بربط مجموعة (-SH) الحرة بحمض Iodoacetic acid او Iodoacetamide ثم يتم التحليل باستخدام حمض الهيدروكلوريك كما سبق توضيحه فى الانحلال الحمضى ، ويقدر بعد ذلك S-Carboxymethylcysteine حيث انه مقاوم تماما للتحليل الحمضى .

خطوات العمـــل :

يضـاف : ٢ر٤ جم يوريـــا
٣ر٠ مل من ٥ ٠/٠ الملح الصوديومى الثنائى للاديتا

١ر٠ مل عيارى من ايدروكسيد الصوديوم المحتوى على ٢٦٨ر٠ جم يوديد حمض الخليك

يضاف الى : ٣ مل من ١ر٤٣ مول " tris-HCl Buffer 8.0 pH "

و يضاف ١ — ٥ ملجم بروتين تذاب فى ١ مل من المحلول السابق و تترك تحت جو من الازوت لمدة ٣٠ دقيقة فى درجة حرارة الغرفة ثم يضاف ١ مل من حمض الخليك الثلجى ثم يتم التخلص من هذه المواد و عـزل البروتين الذى تم تثبيت الكبريت فيه بواسطة التحليل الغشائى " Dialysis " ثم يجرى عليه التحليل الحمضى السابق ذكره ٠

٢- الانحلال القلوى ALKALINE HYDROLYSIS

و من عيوب طرق الانحلال الحمضى ان الحمض الامينى التريبتوفان يفقد اثناء الانحلال و قد تمكن كل من Knox و مساعديه سنة ١٩٧٠ و Pon و مساعديه سنة ١٩٧٠ من تعديل طريقة الانحلال القلوى استخدام ايدروكسيد الباريوم ، و بذلك يمكن الحفاظ على ٩٥ ٠/٠ من نسبة التريبتوفان فى البروتين بعد انحلاله ٠

وفى هذه الطريقة تنقل العينة الى انبوبة الانحلال ، ويضاف اليها ايدروكسيد الباريوم ويتم التخلص من الاكسجين الذائب والهوائى كما فى الطريقة السابقة ثم يترك المحلول على درجة ١١٠ ْ م لمدة ١٦ — ١٨ ساعة ٠

بعد ان يروق المحلول يعادل المحلول بحمض كبريتيك مناسب التخفيف حتى درجة حموضة (pH ٢) فيترسب الباريوم على صورة كبريتات باريوم تفصل بالطرد المركزى للحصول على المحلول الرائق المتحلل ٠

وهناك طرق اخرى للتحليل القلوى فى العينات التى تحتوى على التربتوفان منها الطريقة التى اشار اليها Charg's & Liu سنة ١٩٧١ ، وفيها يستخدم حمض p-toluenesulphonic قوة ٣ عيارى بدلا من حمض الايدروكلوريك ، وهذه الطريقة تكون مناسبة لانحلال العينات التى تحتوى على نسبة من الكربوهيدرات تزيد عن ٥٠ ٪ ، وبعد تمام الانحلال تعادل حموضة العينة بواسطة ايدروكسيد الصوديوم ٠

هذا وقد وجد Penke ومساعدوه سنة ١٩٧٤ انه يمكن الاستعاضة عن حمض p-toluenesulphonic acid
بحمض mercaptoethane sulphonic

٣- الانحلال الانزيمى
ENZYMIC HYDROLYSIS

يمكن استخدام انزيمات مختلفة متخصصة لفك الروابط الببتيدية فى السلاسل الببتيدية ومع ذلك فلاتوجد طريقة عملية دقيقة لمعرفة الوقت الذى يتم فيه الهضم بهذه الكيفية المطلوبة ، ويستخدم لذلك انزيمات محللة للبروتين ٠ ومنها :

١ - التربسين	Trypsin
٢ - الكيموتربسين	Chymotrypsin
٣ - الكربوكسى ببتيديز	Carboxypeptidase
٤ - البيسين	Pepsin
٥ - البيتديز الداخلى	Indopeptidase
٦ - الثنائى ببتيديز	Dipeptidase
٧ - الامينو ببتيديز	Aminopeptidase

عينات البلازما PLASMA SAMPLE

تقدير الاحماض الامينية فى البلازما تعوقه مشكلتان هما :

١ فصل الاحماض الامينية عن جزيئات المواد البروتينية الاخرى عالية الوزن الجزيئى

٢ فصل اميدات الجلوتامين و الاسبارجين

و للتغلب على هاتين المشكلتين تتبع طرق مختلفة منها :

أ- طريقة حمض البكريك PICRIC ACID METHOD

و هذه الطريقة نشرها Moore & Stein سنة ١٩٥٤ و تتلخص فيما يلى :

يضاف الى ٤ مل من البلازما ٤ مل من حمض البكريك Picric acid تركيز ١ ٪ وبعد الخلط تفصل العينة بالطرد المركزى (السرعة العالية) لمدة ١٠ دقائق على جهاز طرد مركزى صغير .

ب- طريقة حمض سلفوساليك SULPHOSALICYCLIC ACID METHOD

وهذه الطريقة نشرها Mondino ومساعدوه سنة ١٩٧٢ وفيها تعامل البلازما بحمض Sulphosalicyclic acid وذلك بتحضير من ذلك الاخير فى محلول منظم Buffer من سترات الليثيوم و ٣ر٠ عيارى 0.3 N Lithium citrate . ويضبط عند (pH ٨ر١)
ويضاف من هذا المحلول ٤ مل الى ١ مل من البلازما ويخلط ، ثم يفصل المخلوط بالطرد المركزى على سرعة ١٠٠٠ (r.p.m.) لمدة ١٠ دقائق على درجة الصفر المئوى .

ج- طريقة الطرد المركزى العالى CENTRIFUGE METHOD

امكن فصل البلازما بالطرد المركزى العالى لفصل الجزيئات العالية الوزن الجزيئى من البروتينات وغيرها عن الاحماض الامينية الحرة كوسيلة لتنقيتها قبل فصل الاحماض الامينية كروماتوجرافيا ، وفيما يلى السرعات التى اقترحها بعض الباحثين :

١ — (١٨ الف لفة فى الدقيقة (18,000 r.p.m.
لمدة ٣٠ دقيقة على درجة الصفر المئوى ، اقترحها Gerritsen
و مساعدوه سنة ١٩٦٥.

٢ (٣٦٨ الف لفة فى الدقيقة (368,000 r.p.m
لمدة ٣٠ دقيقة على درجة ٨ °م اقترحها Benson و مساعدوه
سنة ١٩٦٧ .

د- طريقة الترشيح FILTERATION METHOD

وصف Eaker سنة ١٩٧٠ طريقة لترشيح البلازما بمرشحات الجيل Gelfitration لفصل الجزيئات البروتينية العالية الوزن الجزيئى عن الاحماض الامينية ، و هذه الطريقة مناسبة لفصل العديد من العينات الفسيولوجية مثل البلازما و مصل الدم و البول و السوائل البينية و غيرها .

هـ- طريقة الترسيب PRECIPTATION METHOD

و فيها يتم ترسيب البروتينات الاخرى عن الاحماض الامينية بالمواد المرسبة للبروتين مثل : Tungestates & Trichlorcacetic acid
ثم ترشـــح .

التخلص من الحمض الزائد

تفتح انبوبة التحليل ، و يمكن التخلص من الزائد من حمض الهيدروكلوريك باستخدام التبخير تحت ضغط مخلخل – شكل (١٢) .

و يجب ان تركب مصايد لحمض الايدروكلوريك فى الوصلات بين العينة و المضخة حتى لا يؤثر بخار الحمض على المضخة و يتلفها ، بحيث يحتوى المصايد على مكثف و مصيدة من الصودا الكاوية لامتصاص بخار الحمض و كلوريد الكالسيوم لامتصاص بخار الماء . شكل (١٣)

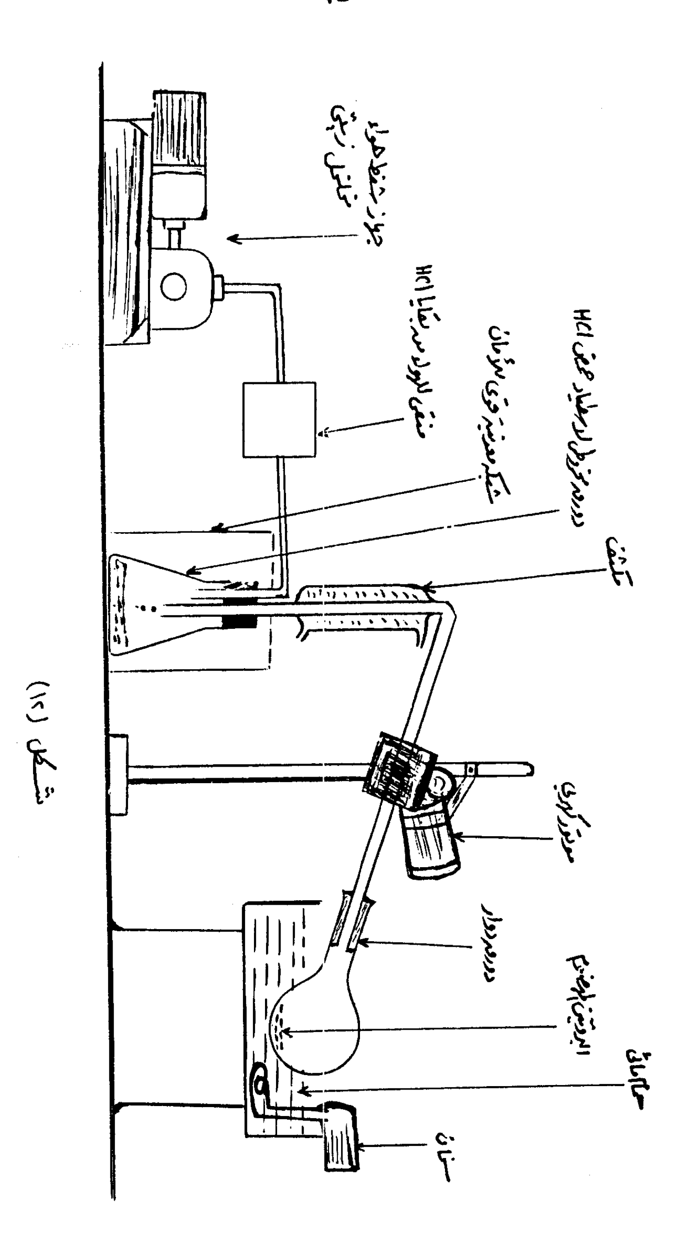
ضبط حجم المحلول

تتم اذابة المهضوم بعد تجفيفة من حمض الايدروكلوريك بالطريقة السابقة بثلاث طرق هـى :

١ – فى الماء المقطر فى حالة التقدير بالطرق الميكروبيولوجية

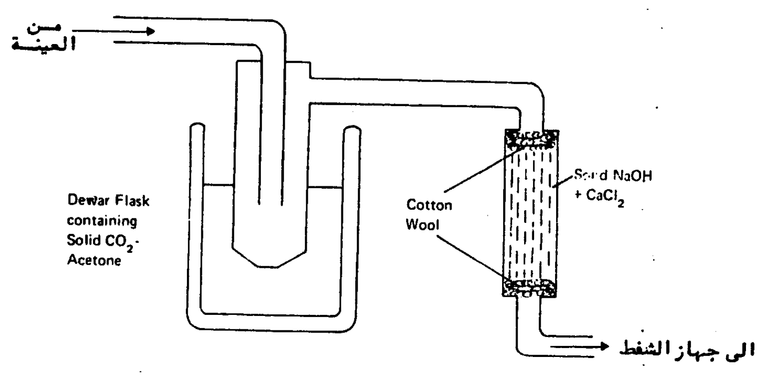
٢ – فى ١٠ ٪ كحول ايزوبروبيل فى حالة التقدير بالكروماتوجرافى الورقى او الطبقة الرقيقة

٣ – فى ١ر٠ – ٢ر٠ عيارى حمض ايدروكلوريك (pH ٢ر٢) فى حالة التقدير على جهاز (AAA) و فى بعض الاحيان يستخدم محلول خاص منظم عند نفس درجة الحموضة مع الاجهزة .


جهاز شفط هواء مخلخل زيتي
منقي للهواء من بقايا HCl
شبكة معدنية قوية للأمان
دورق مخروطي لاصطياد حمض HCl
مكثف
موتور كهربي
دورق دوار
البروتين المهضوم
حمام مائي
سخان

شكل (١٢)

يضبط حجم المحلول الذائب حسب طريقة التحليل و يرشح ،و فى جميع الاحوال عند تخزين العينة المهضومة تخزن قبل فتح انبول الهضم او تخزن باضافة بضع نقط من التلوين ، و تخزن عينات المهضوم او الاحماض الامينية القياسية دائما مجمـــدة ٠



شــكل (١٢)

تنقية الهواء من بقيا حمض الايدروكلوريك قبل
دخوله الى جهاز الشـــفط

مراجع الفصل الثانى

1 Benson,J.V.; Gordon,M.J. & Patterson,J.A., Anal. Biochem. 18:228 (1967)

2 Eaker,D.; In evaluation of novel protein products, Bender-Kihlberg-Löfquist-Munch. Editors Pergamon Press, Oxford, New York (1970)

3 Gerritsen,T.; Rehberg,M.L.& Waisman,H.A. Anal. Biochem. 11: 460 (1965).

4 Knox,R. et al, Anal. Biochem. 35: 136 (1970)

5 Liu, T.Y. & Chang, Y.H., J. Biol. Chem. 246: 2842 (1971)

6 Mondino, A. et al, J. Chrom. 74: 255 (1972)

7 Penke,B.et al . Anal. Biochem., 60: 45 (1974)

8 Pon, N.G. et al, Biochem. 9: 1506 (1970)

9 Stein, W.H. & Moore,S.S. J.Biol. Chem.211:915 (1954).

$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$
$$$$$$$$$$$

الفصل الثالث

التقدير الميكروبيولوجى للأحماض الأمينية

MICROBIOLOGICAL ASSAY

نظرا لعدم اعتماد طريقة التقدير الميكروبيولوجى للاحماض الامينية على فكرة الفصل الكروماتوجرافى لذ لك فان عملية التحليل (الهضم) التى تتم لتفكيك الروابط الببتيدية داخل البروتين المراد تقدير الاحماض الامينية فيه لا تحتاج الى الاحتياطات الكثيرة - والمكلفة كما هو الحال فى الاعداد للفصل الكروماتوجرافى ٠

ولذ لك نذكر الطريقة البسيطة للهضم المناسبة لهذا النوع من التقدير :

أولا : الهضم الحمضى ACIDIC HYDROLYSIS

ويستخدم هذا الهضم لتقدير جميع الاحماض الامينية ما عدا السستين والتريتوفان وتتم كالاتى :

١ تضاف ٢ جم من المادة المراد تحليلها على ان تكون ناعمة تماما الى ٢٥٠ مل

من حمض ايد روكلوريك ٦ عيارى و ترج لعمل معلق فى دورق كروى او مخروطى بفوهـــة مصنفرة ٠

٢ يركب على الدورق الكروى مكثف ماكسر و توضع على سخان لتغلى لمدة ١٨ ساعة شكل (١٤) ٠

٣ يبخر الزائد من حمض الايد روكلوريك تحت ضغط مخلخل حتى يصل المتبقى الى حجم ٥ مل (يمكن استخدام نفس الجهاز شكل ١٢) ٠

٤ يذاب المتبقى فى حوالى ١٠٠ مل ماء مقطر و يضبط (pH عند ٣٫٥) باستعمال ايد روكسيد صوديوم ٤٠ ٪

٥ يضاف الماء المقطر الى حجم ٢٠٠ مل ثم ترشح ، ويضاف الى المترشح عدة نقط من التولوين Toluene و يحفظ فى الثلاجة ٠

و قبل استعمال المهضوم لتقدير الاحماض الامينية يعاد ضبط الحموضة عنـــد (pH ٦٫٨) باستعمال محلول ايد روكسيد الصوديوم ٠

مكثف

دورق الهضم

شكل (١٤) جهاز هضم بروتين ذو ماكسر

ثانيا : الهضم الحمضى لتقدير السستين

١ يؤخذ ١ جم من العينة المطحونة ، و يضاف اليها ١٠٠ مل حمض ايد روكلوريك ٢٫٥ عيارى ٠

٢ يوضع المخلوط فى اتوكلاف على درجة ١٢٠ °م لمدة لمدة ٢٫٥ ساعة ، ثم تعاد عليه نفس خطوات التحليل الحمضى السابق ذكرها ٠

٣ يضبط المحلول النهائى بحجم ١٠٠ مل بالماء المقطر ثم يحفظ المحلول المهضوم فى وجود عدة نقط من التولوين فى الثلاجة ٠

ثالثا : المضم القلوى لتقدير التربتوفان

ALKALINE HYDROLYSIS

١ ٢ جم من المادة المراد تحليلها توضع فى دورق ٥٠٠ مل يضاف اليها ٥٠ مل من محلول ايدروكسيد الصوديوم ٥ عيارى ، ثم تهضم بالطريقة السابق شرحها فى الهضم الحمضى لمدة ١٨ — ٢٠ ساعة ٠

٢ يضبط pH المحلول عند ٦,٨ باستعمال محلول حمض ايدروكلوريك ٦ عيارى ويكون محلول ٢٠٠ مل بالماء المقطر ، ويضاف اليه عدة نقط من التولوين ٠

٣ يرشح المحلول و يخزن فى الثلاجة ٠

و تعتمد طريقة التقدير الميكروبيولوجى للاحماض الامينية على قياس نمو انواع متخصصة من البكتريا نتيجة اضافة محلول قياسى من الاحماض الامينية ، ما عدا الحمض الامينى المراد تقديره مع اضافة مصدره من العينة المراد تقدير الحمض بها و يقارن هذا النمو بنمو نفس البكتريا على تركيزات مختلفة من هذا الحمض ، و يقاس نمو البكتريا بمقدار تحويلها للجلوكوز الى حمض اللاكتيك يمكن معايرته بقلوى معلوم القوة ، و فيما يلى الطريقة التفصيلية للتقدير ٠

الكائنات الدقيقة المستخدمة MICROORGANISM

تستخدم لذلك ثلاثة انواع من الاحياء الدقيقة هى :

(١) Lactobacillus arabinosus 8014 لتقدير الفالين والتريتوفـــان

(٢) Leuconostoc mesenteroides P.60 لتقدير كل من :
الاسبارتيك ، اللايسين ، الجلايسين ، الهستدين
الليوسين ، الايزوليوسين ، الفينيل الانين ، البروليـــن
الســيرين ، الثريونيـــن ، التيروزيـــن ، الجلوتاميك ،
الميثايونيـــن .

(٣) Leuconostoc citrovorum 8081 لتقدير كل من :
الالانين ، الارجينين ، الســـستين

تحضير البيئة MEDIUM

(أ) بيئـة الاجـــار Culture agar medium

تتكون بيئة البكتريا المستخدمة فى التقدير من ٤٧ جم من " اجـــار ديفيكو (Difico " 0319-02) تذاب فى ١٠٠ مل ماء مقطر وتسخن

الى الغليان ، ويؤخذ منها ١٠ مل فى انبوبة اختبار قطر ١٦ _ ٢٠ مم وتسد الانبوبة بالقطن وتعقم فى اتوكلاف على ضغط (١٥) ودرجة حرارة ١٢٠ درجة مئوية لمدة ٢٠ دقيقة ، ثم تبرد ٠

(ب) بيئة الالقاح Micro inoculum borth

وتحضر من المواد بالكميات التالية :

Bacto-tryptone (Difico 0123-02)	0.5 gm.
Yeast extract (Difico 0127-01)	0.1 gm.
Sodium acetate water free	[illegible].0 gm.
Glucose	1.0 gm.
Salt A	1.0 ml.
Salt B	1.0 ml.

ويضبط pH على ٦٫٨ ويصنع من هذه الكميات محلول حجمه ١٠٠ مل باستعمال الماء المقطر ، يؤخذ منه ٥ مل توضع فى انبوبة الطرد المركزى وتسد بالقطن وتعقم فى اتوكلاف عند (١٥) ضغط ودرجة حرارة ١٢١ °م لمدة ٢٠ دقيقة وتوضع فى الثلاجة لحين الاستعمال ٠

تحضير البيئة القاعدية PREPARATION BASIC MEDIUM

١- بيئة ستيل Steel medium

وتستخدم هذه البيئة عند تقدير : الميثايونين ، الاسبارتيك ، الجلايسين الهستدين ، الايزوليوسين ، الليوسين ، اللايسين ، الفينيل الانين ، البرولين ، السيرين ، الثريونين ، التيروزين ، الفالين ٠

وتحضر هذه البيئة فى المعمل طبقا لطريقة Steel et al1949 من المكونات التاليـــة :

محلول ادينين ، جوانين ، يوراسيل	Adenine, Guanine, Uracil	٠ر٢ مل
جلوكـــوز	Glucose	٠ر٥ جم
خلات الصوديوم خالية من الماء	Sod. acetate	٠ر٤ جم
كلوريد الصوديوم والامونيوم	Sod.&Amm. Chloride	٢ر١ جم
محلول الاحماض الامينية	Amino Acids	٠ر٥٠ مل
محلول الاكزنســـين	Xanthin solution	٠ر٢ مل
محلول الملح (أ)	Salt A	٢ر٤ مل
محلول الملح (ب)	Salt B	٠ر٢ مل
محلول الفيتامينات	Vitamins solution	٠ر٢ مل

يضبط pH عند ٦٫٨ باستعمال ٤٠ ٪ ايدروكسيد صوديوم ويكمل الحجم الى ١٠٠ مل باستعمال الماء المقطر .

عند تقدير الجلوتاميك يضاف الى كل ١٠٠ مل من بيئة ستيل ٤٠ ملجم من الجلوتامين (٢ ٪) .

وفى تقدير الالانين ، والارجينين ، والسستين يضاف ٢ مل من العامل (C.F) الى بيئة ستيل .

تحضير مكونات بيئة ستيل

(١) كلوريد الصوديوم والامونيوم : Sod. & Amm. Chloride

تضاف كميات متساوية من كلوريد الصوديوم وكلوريد الامونيوم وتخلط جيدا

(٢) محلول الاحماض الامينية : Amino acids solution

ويحضر لكل حمض امينى يراد تقديره محلول خاص به من الاحماض الامينية التى تحتوى على جميع الاحماض الاخرى ما عدا الحمض المراد تقديره (جدول ٥) .

وتذاب الكميات السابقة فى ٧٠ مل من حمض ايدروكلوريك عيارى ، ويكمل الحجم الى ٥٠٠ مل بالماء المقطر .

جـــدول (٥)

Amino Acids	mg.	Amino Acids	mg.
DL-Alanine	400	L-Glutamic acid	600
L-Arginine-HCl	500	Glycine	200
L-Asparagine-H_2O	800	L-Histidine-HCl H_2O	140
L-Aspartic acid	200	L-isoLeucine	250
L-Cystine-HCl	150	L-Leucine	250
L-Lysine-HCl	500	L-Methionine	100
L-Phenylalanine	100	L-Proline	200
L-Serine	50	L-Threonine	200
L-Tryptophan	40	L-Tyrosine	200
L-Valine	250		

(٣) محلول الادينين جوانين يوراسيل : Adenene, Guanine, Uracil

٥٠٠ ملجم من كل من الادينين ، الجوانين ، اليوراسيل تضاف الى ٢٥ مل من حمض ايدروكلوريك ٦ عيارى ، يسخن المحلول حتى تمام الذوبان ويكمل المحلول الى حجم ٥٠٠ مل باستعمال فى الماء المقطر ٠

(٤) محلول الاكزنسين : Xanthin solution

٥٠٠ ملجم من الاكزنسين يذاب فى ٢٥٠ مل من ايدروكسيد الصوديوم ١ر٠ عيارى ، ويكمل الحجم الى ٥٠٠ مل بالماء المقطر ٠

(٥) محلول الفيتامينات : Vitamins solution

يتكون المحلول من الفيتامينات بالكميات التالية :

ريبوفلافين	١٠	ملجم	
كالسيوم بانتوثيونات	١٠	ملجم	
نيكوتيناميد	٢٠	ملجم	
حمض الفوليك	٢	مل	(١٠٠ ميكروجرام / مل)
ثيامين كلوريد	١٠	ملجم	
بيريدوكسين (كلوريد)	٢٠	ملجم	
بارا – امينو بنزويك	٢٠	مل	(١٠٠ ميكروجرام / مل)
بيوتين	٢ر٠	مل	(١٠٠ ميكروجرام / مل)
حمض خليك ٢ عيارى	٢	مل	

وتخلط جيدا وتذاب فى ماء مقطر ويكمل المحلول الى ٢٠٠ مل

(٦) محلول الملح (أ) : Salt(A) solution

٢٥ جرام من كل من فوسفات البوتاسيوم احادية الايدروجين (K_2HPO_4)
و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الايدروجين (KH_2PO_4) تذاب فى ماء مقطر
و يكمل الحجم الى ٥٠٠ مل ٠

(٧) محلول الملح (ب) : Salt (B) solution

١٠ جرام	سلفات ماغنسيوم
٥ر٠ جرام	سلفات الحديدوز
٥ر٠ جرام	كلوريد صوديوم
٥ر٠ جرام	سلفات المنجنيز

تذاب فى ١٠ مل حمض ايدروكلوريك عيارى و يكمل الحجم الى ٥٠٠ مل
بالمـــاء المقطـــــر ٠

(٨) العامـل (C.F) :

يحتوى على calcium leucovorn بمعدل (٥ر٠ ميكروجرام /مل)
و تضاف الى نقطتين من التلوين و يحفظ فى ثلاجة ٠

(٩) الجلوتامين (٢٠٪) : L-Glutamine 2%

يضاف ٢٠ ملجم من L-Glutamine الى ٩٨٠ ملجرام جلوكوز
و تخلط جيـــدا .

بيئة بارتون - مريت BARTON-WRIGHT MEDIUM

و هذه البيئة تحضـر كبيئة قاعدية عند تقدير السستين و قد اقترحها Barton-Wright سنة ١٩٥٢ كما يلي :

جلوكوز	٤	جرام
كلوريد امونيوم	٤	جرام
محلول ملح (أ)	٢	مل
محلول ملح (ب)	٢	مل
محلول الاحماض الامينية	٥٠	مل
محلول الفيتامينات	٢	مل
محلول الببتون	١٥	مل
محلول الاكزنسـين	٢٫٤	مل
خلات صوديوم (خالية من الماء)	٤	جرام
محلول ادينين ، جوانين ، يوراسيل	٢٫٤	مل

و يضبط (pH عند ٦٫٨) و يكمل الحجم الى ١٠٠ مل بالماء المقطر .

تحضير بيئة بارتون - فريت :

(١) محلول الاحماض الامينية : Amino Acids solution

يتكون من الاحماض الامينية الاربعة التالية

٢٠٠ ملجم	L-Methionine
٢٠٠ ملجم	L-Tyrosine
٢٠٠ ملجم	L-Tryptophan
٢٠٠ ملجم	Glycine

تذاب فى ٢٥ مل من محلول عيارى من حمض ايد روكلوريك و يكمل بالماء المقطر الى ٥٠٠ مل .

(٢) محلول البيتون : Peptone solution

يذاب ١٠ جم من Difco bacto peptone فى ١٠٠ مل من حمض ايد روكلوريك عيارى و يضاف اليه ١٫٣ مل من فوق اكسيد الهيدروجين (٣٠ ٪ وزن فى حجم) و يترك المخلوط لمدة ليلة فى جو الحجرة ، ثم يسخن المحلول فى حمام مائى لمدة نصف ساعة و يضبط (pH عند ٦٫٨) باستعمال ايد روكسيد صوديوم ٤٠ ٪ ،و يسخن مرة اخرى لمدة ساعة فى حمام مائى ثم يبرد و يكمل الى حجم ٢٠٠ مل باستعمال الماء المقطر .

البيئة المستعملة فى تقدير التربتوفان

وتتكون من المواد التالية :

محلول البيتون	٧٥	مل
د ٠ل ميثايونين	١٠٠	ملجم
جلايسين	٢٠	ملجم
ل سستين	٢٠٠	ملجم
ل تيروزين	٤٠	ملجم
جلوكوز (انهيدراس)	٢٠	جرام
خلات صوديوم (هيدريتد)	٣٣	جرام
زيلوز	١	جرام
محلول اكزنسين	١٠	مل
محلول ملح (أ)	٥	مل
محلول ملح (ب)	٥	مل
سلفات امونيوم	٣	جرام
محلول ادينين ،جوانين		
يوراسيل	١٠	مل
محلول الفيتامينات	١٠	مل

ويضبط (pH عند ٦ر٨) ويكمل الحجم الى ٥٠٠ مل بالماء المقطر

تحضير المحلول القياسي الاساسي للاحماض الامينية :

يحضر المحلول القياسي لجميع الاحماض الامينية فيما عدا التريبتوفان بتركيز ١ ملجرام حمض اميني / مل محلول ، اما التريبتوفان فيكون تركيزه ١٠٠ ميكروجرام حمض / مل محلول ، و تحفظ المحاليل القياسية فى الثلاجة لحين الاستعمال ٠

خطوات العمل OPERATION

(١) تحضير الانابيب القياسية :

تحضر المحاليل القياسية المتدرجة لكل حمض اميني من المحلول القياسي الاساسي له بالتركيز الموضح فى جدول ٦

يوضع المحلول القياسي المتدرج فى انابيب المحلول القياسي على ٩ تركيزات متدرجة بحيث تحتوى كل انبوبة ١ مل من المحلول وكل تركيز يعمل له ثلاث انابيب (مكررات) كما فى الشكل (١٥)

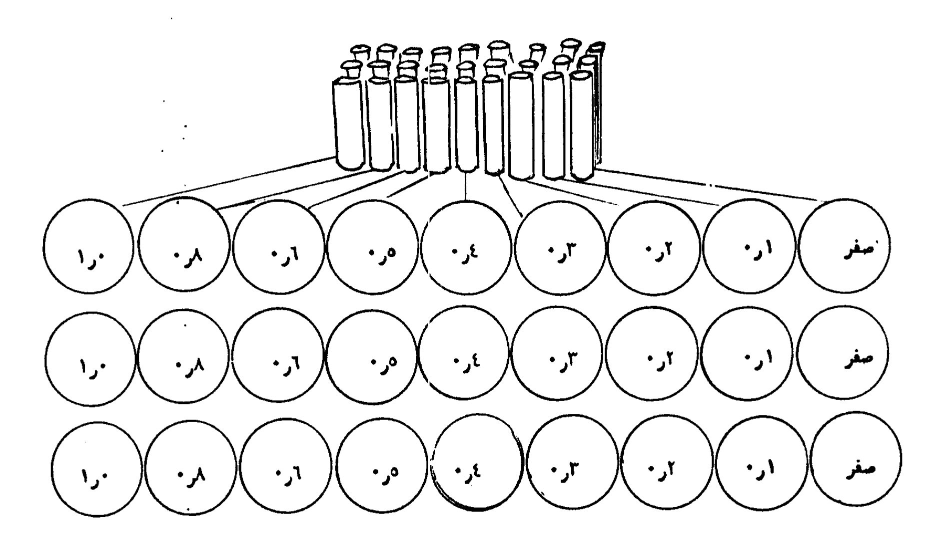
(٢) تحضير انابيب العينة :

يوضع محلول العينة المهضومة فى الانابيب باربعة تركيزات مختلفة بحيث تحتوى كل انبوبة على ١ مل من المحلول وكل محلول يعمل منه مكرران كما فى شكل ١٦

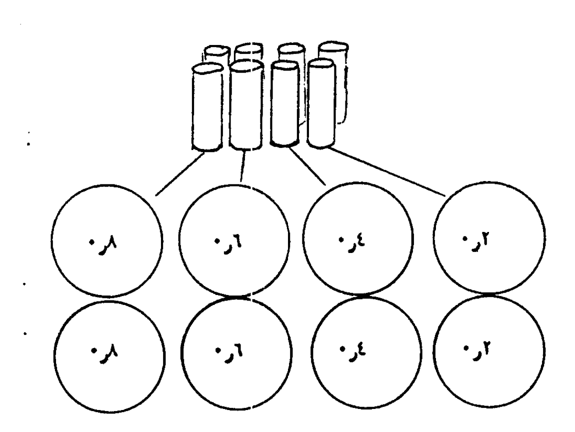
جـدول (٦)

تركيزات الاحماض الامينية القياسية المتدرجـة

الحمض الاميـــنى	حجم المحلول القياسى الاساسى المستخدم	الحجم المخفف اليـــه	التركيز الجديد ميكروجرام/مل
DL- Alanine	٤	١٠٠	٤٠
L-Arginine	٤	٢٠٠	٢٠
L-Aspartic acid	٣	١٠٠	٣٠
L-Cysteine	٢	١٠٠٠	٢
Glycine	٤	٤٠٠	١٠
L-Glutamic acid	٤	٥٠	٨٠
L-Histidine	٥	١٠٠٠	٥
L-isoLeucine	٤	٢٥٠	١٦
L-Leucine	٤	٢٥٠	١٦
L-Lysine	٤	١٠٠	٤٠
L-Methionine	٤	٥٠٠	٨
L-Phenylalanine	٤	٥٠٠	٨
L-Proline	٤	٥٠٠	٨
L-Serine	٤	٤٠٠	١٠
L-Thrionine	٤	٢٠٠	٢٠
L-Tyrosine	٤	٤٠٠	١٠
L-Valine	٤	٢٥٠	١٦
L-Tryptophan	٢	٢٥٠	٥



شكل (١٥) انابيب المحلـول القياسى المتدرجة التركيز



شكل (١٦) تركيزات و مكررات للعينة

يضاف الى كل انبوبة من المحلول القياسى او العينة ١ مل من البيئة المحضرة يصبح حجم المحلول فى كل انبوبة ٢ مل ، ثم تعقم الانابيب فى اتوكلاف عند (١٥) ضغط لمدة ٨ دقائق ٠

التلقيح بالبكتريا

INOCULATION OF THE MICROORGANISM

قبل التقدير بيوم واحد تلقح انبوبة بيئة التلقيح بجزء من بيئة الأجار المحتوية على البكتريا ثم تحضن على درجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة ، ويمكن ملاحظة نمو البكتريا فى نهاية الفترة بحدوث تعكير واضح فى المحلول ثم تجرى عملية طرد مركزى لمدة ٥ دقائق ويستبعد الرائق واما المتبقى فيعلق فى ٢٥ مل من الماء المعقم ، عند اذن يوضع نقطة من هذا المحلول المعقم المحتوى على البكتريا بواسطة ماصة تنقيط معقمة وذلك فى كل انبوبة من انابيب المحلول القياسى المتدرج ، او العينات ، وتحضن فى درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ٣ ـ ٤ ايام (هذه المدة تتوقف على الحمض الامينى المراد تقديره ـ انظر جدول ٧) ٠

وجدول ٧ يوضح موجز للبيانات الخاصة بكل حمض امينى على حده من الخطوات السابقة ٠

جدول (٧)

ملخص احتياجات التقدير الميكروبيولوجي للأحماض الأمينيـــة

الأحماض الأمينية	البيئة المستعملة	نوع البكتريا	تركيز المحلول القياسي ميكروجرام/مل	مدة التحضين (يوم)
DL-Alanine	Steel + C.F	Lc.Citrovorum	40	3
L-Arginine	Steel + C.F	" "	20	3
L-Aspartic acid	Steel	Lco. mesenter-oides	30	3
L-Cystine	Barton-Wright + C.F	Lc. citrovorum	2	3
Glycine	Steel	Lc. mesenter-oides	10	3
L-Glutamic acid	Steel + glutam-ine	" "	80	3
L-Histidine	Steel	" "	5	3
L-isoLeucine	"	" "	16	3
L-Leucine	"	" "	16	3
L-Lysine	"	" "	40	3
L-Methionine	"	" "	8	3
L-Phenylalanine	"	" "	8	3
L-Proline	"	" "	8	4
L-Serine	"	" "	10	4
L-Threonine	"	" "	20	4
L-Tryptophan	"	Lactobacillus arabinosus	2	3
L-Tyrosine	"	Lc. Mesenter-oides	10	3
L-Valine	"	Lactobacillus arabinosus	16	3

عملية المعايرة — *TITRATION*

بعد انتهاء فترة الحضانة يستعمل قياس الحمض الناتج عنها دليلا على مقدار نموها ، حيث يتم معايرة الحمض بواسطة ايدروكسيد صوديوم ٠,١ عيارى ، ويقدر الحجم اللازم لمعايرة الحمض المتكون فى كل انبوبة من الانابيب الثلاث لكل تركيز ويحسب متوسطها ويرسم المنحنى القياسى للحمض ، وكذلك تحسب كمية القلوى اللازم لمعايرة الحمض المتكون فى كل انبوبة من الانابيب الخاصة بالعينة ، ثم يؤخذ متوسطها ، و توقع على المنحنى القياسى و تحسب كمية الحمض عند كل تركيز و يؤخذ متوسطه النهائى ٠

مثال

اذا كانت نتيجة المعايرة للتركيزات المختلفة المتدرجة للمحلول القياسى لليوسين هى كما فى الجدول ٨ ، ارسم المنحنى القياسى له ومنه احسب نسبة الليوسين فى كل ١٠٠ جرام بروتين للعينة التى كانت نتيجة المعايرة فيها للتركيز المقابل لها كما فى جدول (٩) وكانت نسبة البروتين فيها ٤٨ ٪ و تم تخفيف العينة المهضومة عند تقدير الليوسين ١ : ٢٥

جدول (٨) :

حجم المحلول القياسى المتدرج (مل)	صفر	٠,١	٠,٢	٠,٣	٠,٤	٠,٥	٠,٦	٠,٨	١,٠
متوسط حجم ايدروكسيد الصوديوم ٠,١ عيارى (مل)	٠,٢١	٠,٢٥	٠,٦٣	٠,٨٨	١,١٣	١,٢٨	١,٤١	١,٥٩	١,٩١

جدول (٩) :

حجم المحلول من العينة المهضومة (مل)	٢ر٠	٤ر٠	٦ر٠	٨ر٠
متوسط حجم ايدروكسيد الصوديوم (مل)	٤٤ر٠	٦٥ر٠	٧٢ر٠	٨٨ر٠

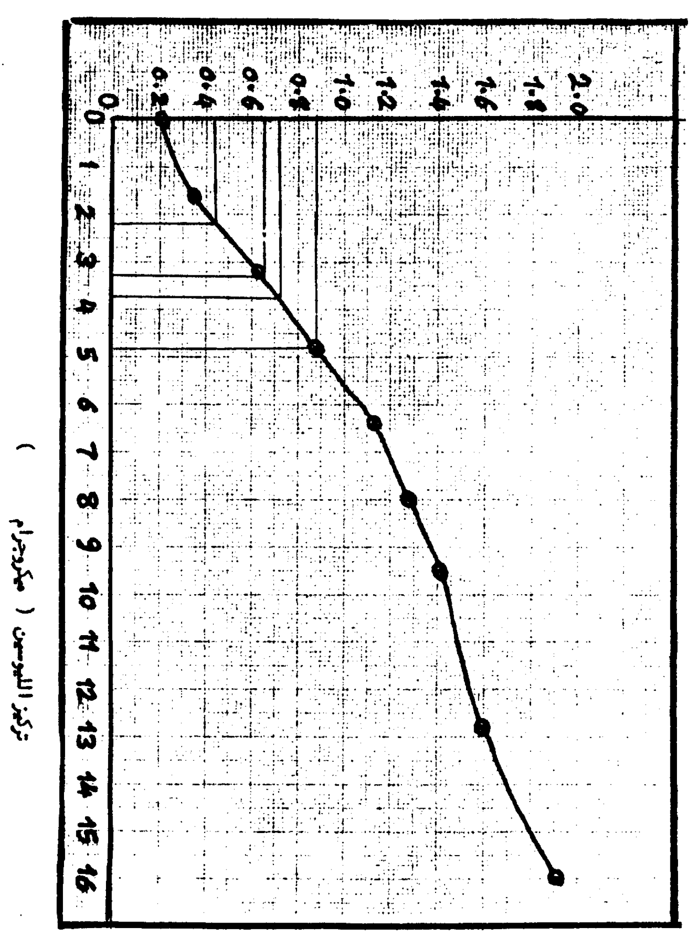
الحل

تركيز المحلول القياسى المتدرج لليوسين = ١٦ ميكروجرام / مل

و بالتالى يكون التركيز المتدرج كما فى الجدول التالى :

حجم المحلول القياسى المتدرج (مل)	صفر	١ر٠	٢ر٠	٣ر٠	٤ر٠	٥ر٠	٦ر٠	٨ر٠	١ر٠٠
التركيز (ميكروجرام/)	صفر	١,٦	٣,٢	٤,٨	٦,٤	٨,٠	٩,٦	١٢,٨	١٦,٠
متوسط حجم المعايرة (مل)	٢١ر٠	٣٥ر٠	٦٢و	٨٨و	١,١٣	١,٢٨	١,٤١	١,٥٩	١,٩١

و من الجدول يرسم المنحنى القياسى بين التركيز و حجم المعايرة كما فى شـكل ١٧ ٠



شكل (١٧) المنحنى القياسى لليوسين

جدول تركيز العينات :

حجم المحلول من العينة (مل)	٢ر٠	٤ر٠	٦ر٠	٨ر٠
كمية العينة (ميكروجرام)	٨٠	١٦٠	٢٤٠	٣٢٠
كمية الحمض الاميني (ميكروجرام)	٢ر٢	٣ر٣	٣ر٧	٤ر٨
كمية البروتين (ميكروجرام)	٣٨ر٤	٧٦ر٨	١١٥ر٢	١٥٣ر٦
النسبة المئوية للحمض فى البروتين	٥ر٧	٤ر٣	٣ر٢	٣ر١

متوسط النسبة المئوية لليوسين فى بروتين العينة = ٤ر١ ٪

مراجع الفصل الثالث

Steel, B.F.; Sauberlich, H.E.; Reynolds, M.S. and Baumann, C.A.(1949): Media for Leuconostoc mesenteroids P-60 and Leuconostoc citrovorum 8081. J.Biol. Chem., 177 : 533.

Barton-Wright, E.C.(1952): The microbiological assy of the vitamin B complex and amino acids P. 117 , London Issac. Pitaman and Sons Ltd.

$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$
$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$
$$$$$$$$$$

الفصل الرابع

الفصل الكروماتوجرافى للأحماض الامينية

CHROMATOGRAPHY SEPARATION

يستخدم لفصل الاحماض الامينية عدة طرق للتحليل الكروماتوجرافى هى :

(١) الكروماتوجرافى الورقى Paper Chromatography (PC)

بنوعيه : ذو الاتجاه الواحد (ODPC)
One-Dimension paper chromatography

وذو الاتجاهين (TDPC)

(٢) الكروماتوجرافى بالطبقة الرقيقة Thin layer chromatography (TLC)

و منه نوعين ايضا ذو الاتجاه الواحد وذو الاتجاهين

(٣) كروماتوجرافيـــا الاعمـدة : Column Chromatgraphy (CC)

و يستخدم فيها التحليل الاتوماتيكى فى اجهزة خاصة تسمى اجهزة التحليل

التلقائى (الاتوماتيكى) للاحماض الامينية (AAA)

Amino Acid Analyzer

(٤) كروماتوجرافيــا الغاز (GLC) Gas-Liquid Chromatography

ومنه نوعان : العادى ، والعالى الاداء (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography

(٥) الالكتروفورسيز عالية الفولت (HVEP) High Voltage Electrophoresis

وتتميز بسرعة الفصل وقلة التكاليف

وسوف نتناول بعض الطرق بالتفصيل فى تقدير الاحماض الامينية ، ونبدأ اولا بذكر الموضوعات المشتركه فيها جميعا والقواعد العامة المشتركه للتفاعل والتقدير واسس الفصل الكروماتوجرافى فيما يلى :

التفاعل مع النهيدرين

وهو من اهم التفاعلات اللونية التى تستخدم فى تقدير الاحماض الامينية كما والننهيدرين هو " هيدريدين ثلاثى الكيتون " (Ninhydrin)

Triketohydrindene hydrate

Ninhydrin

و يتفاعل النتهيدرين مع الاحماض الامينية و ينتج ثانى اكسيد الكربون و النشادر و الدهيد الحمض الامينى الذى يحتوى على عدد من ذرات الكربون اقل من الحمض المتفاعل بذرة واحدة و ينتج لون ازرق ارجوانى لتكوين هيدرينول ثنائى الكيتون Diketohydrinole و يستخدم هذا التفاعل فى التقدير الكمى للاحماض الامينية باستخدام طرق التحليل الكروماتوجرافى

$$\text{Ninhydrin} + R-CH(NH_2)-COOH \rightleftharpoons \text{(indanedione)}-OH + R-CHO + CO_2 + NH_3$$

و تعطى الاحماض الامينية الوانا مختلفة مع النتهيدرين و ذلك بعد تسخينها حيث يتحد جزئين من النتهيدرين بعد تأكسدهما بالحمض الامينى مع الامونيا و يتكون مركب ذو لون مميز : (جدول ١٠)

Ruheman's Purple

و فكرة الفصل الكروماتوجرافى كما نعلم تعتمد على تحرك مذيب (سائل او غاز) يسمى الطور المتحرك mobile phase على مادة ساكنة (صلبة او سائلة) تسمى الطور الساكن immobile phase و تتنازعان فيما بينهما المادة المراد فصل مكوناتها حيث يكون لكل مكون من مكونات المادة المراد فصلها معدل ثابت للحركة مع تنازع هذين الطورين تختلف من مكون لاخر ، و تعرف النسبة بين حركة اى مكون يتحركها عن نقطة بداية ثابتة و بين حركة الطور المتحرك عن نفس النقطة من خلال حركتها على الطور الساكن بـ (R_f value) و هى خاصية ثابتة لكل مركب مع طورين معينين (طور متحرك و طور ساكن) .

و الجدول ١١ يوضح قيمة R_f x ١٠٠ للاحماض الامينية عندما كان الطوران المتفاصلان هما :

الطور المتحرك : يتكون من خليط من البيتانول الطبيعى ، حمض الخليك و الماء بنسبة ٤ ؟ ١ : ١ n-butanol:Acetic acid: water

الطور الساكن : سيلكا جيل ج Silica Gel -G

جدول ١٠ : اللون المميز لكل حمض امينى مع تفاعل النتهيدرين

الاحماض الامينية	اللون مع النتهيدرين
الالانين السيرين الستائين الثريونين الفالين الليوسين الايزوليوسين الميثايونين الجلوتاميك الجلوتامين الارجنين اللايسين	بنفسجى
الجلايسين	بنفسجى مائل الى الاحمر
الاسبارتيك	بنفسجى مائل الى الازرق
الاسبارجين	برتقالى مائل الى البنى
البرولين	اصفر
الفينيل الانين التيروزين التريتوفان الهستدين	بنفسجى رمادى

جدول : ١١ قيمة R_f x ١٠٠ للاحماض الامينية مع طور ساكن سليكا جيل ج و طور متحرك خليط من : بيوتانول : حمض خليك : ماء (٤:١:١)

الحمض الامينى	R_f x 100	الحمض الامينى	R_f x 100
اللايسين	٣	الثريونين	٢٠
الهستدين	٥	الالانين	٢٢
الارجنين	٦	الجلوتاميك	٢٤
السستائين و تقدر		الفالين	٣٢
كسستيك اسد	١٠	الميثايونين	٣٥
الاسبارجين	١٤	التيروزين	٤١
البرولين	١٤	الفينيل الانين	٤٣
الجلوتامين	١٥	الايزوليوسين	٤٣
الاسبارتيك	١٧	الليوسين	٤٤
السيرين	١٨	التربتوفان	٤٧
الجلايسين	١٨		

و لكى يكون تفاصل الاحماض الامينية نقيا ، ويمكن عزله و تقديره يجب الا تقل المسافة بين مركز بقعة الحمض و مركز بقعة الحمض الذى يليه عن ١٢ مم ، و لذلك يجب ان لا تقل حركة الحمض التى يتحركها الطور الساكن عن

$$\frac{١٫٢ \times ١٠٠}{١} = ١٢٠$$ سم لكى يمكن الفصل الجيد للاسبارتيك عن السيرين و الهستدين من الارجنين و الليوسين عن الايزوليوسين حيث الفرق بين قيم R_f x ١٠٠ لكل زوجين منهما واحد فقط .

فى حين انه يصعب تماما فصل الجلايسين عن السيرين والاسبارتيك والاسبارجين عن البرولين والفينيل الانين عن الايزوليسين ، فى ظل هذا التفاصل لتساوى قيمة R_f لكل زوجين منها تقريبا .

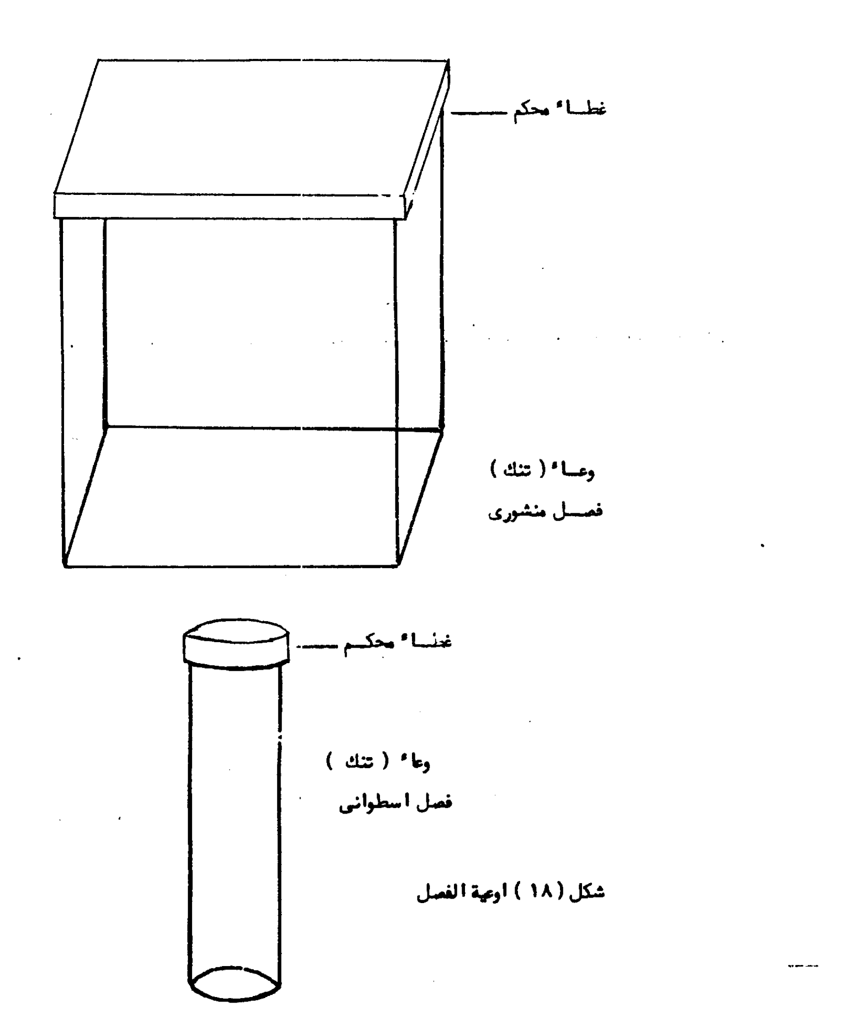
و سواء احتاج الامر الى ورقة طويلة او لوحا طويلا بما يشكله ذلك من صعوبة او كانت الصعوبة مستعصية فان عملية التفاصل بالنسبة للاحماض الامينية نظرا لعددها الكبير وتقارب قيم R_f لها ، كان لابد لها من معالجة من نوع خاص .

تنك الفصل JAR

و هى اوعية زجاجية لها اشكال وابعاد مختلفة والشائع منها المنشورى او الاسطوانى الشكل (شكل ١٨) وابعاده الشائعة فى النوع المنشورى ٤٠ سم عرضا ، ٤٤ سم طولا ، ٦٠ سم ارتفاعا ، وله غطاء محكم من الزجاج بـــه موضع تعليق ورقة الترشيح .

ورق الترشيح STRIPS

يحضـــر شريط ورق الترشيح Strips بالابعاد المناسبة فاذا كان المطلوب فصل عينة واحدة فى الكروماتوجرام الواحد بالطريقة احادية التفريق تكون ابعاد الشريط من ٥ ــ ٧ سم عرضا ، ٢٥ ــ ٣٠ سم طولا (شكل ١٩) واذا كان يراد فصل اكثر من عينة على نفس الكروماتوجرام الواحد فتكون الابعاد من ٢٥ ــ ٣٠



شكل (١٨) اوعية الفصل

شكل (١٩) Strip
معد للفصل احادى
التفريـــق

مكان العينة

شكل (٢٠)
Strip
معـد للفصـل ثنائى
التفريـــق

مكان العينة

سم لكل ضلع ، وفى حالة الطريقة الثنائية التفريق تستخدم اوراقا ذات ابعاد مشابه للنوع الاخير او اقل قليلا ، وعموما يحدد ابعاد شرائط الورق كل من نوعية المادة المراد تحليلها وحجم التنك المستخدم شكل ٢٠ ٠

يرسم خط بالقلم الرصاص على بعد ٥ر٢ سم من احد اطراف الورقة وتوضع نقطة على بعد ٣ سم من احد الجوانب ثم نقط اخرى على نفس الخط على ابعاد تتراوح بين ٢ — ٥ر٢ سم من بعضها ، وتستخدم كل نقطة كبداية لعينة مقاســـة واحـدة ٠

ويجب ان يكون الورق المستعمل له خواص امتزازية وذو تركيب متجانس ويلاحظ ان الورق من نوع (واتمان رقم ١) Whatman No.1 تنطبق عليه هذه الشروط ويعتبر هو اول مادة دعامية استعملت فى التحليل الكروماتوجرافى ولهذا السبب فان معظم المراجع تضع ارقام (R_f) مستخدمة هذا النوع من الورق ، وتوجد انواع اخرى مماثلة من الورق اهمها :

(١) واتمان رقم (١) Whatman No. 1
ويستخدم اذا كان المطلوب اجراء الفصل ببطء

(٢) واتمان رقم (٤) Whatman No. 4
ويستخدم اذا كان المطلوب اجراء الفصل بسرعة ، ويعطى فصلا ممتازا فى حالة الكروماتوجرافيا بالتفاصل الصاعد

(٣) واتمـان رقم ٣ Whatman No. 3
وهو ورق سميك ويستخدم فى التقدير الكمى

(٤) واتمـان رقم (٥٤) Whatman No. 54
وهو نوع من ورق الترشيح المقاوم للتمزق حتى اذا كان المطلوب اجراء التفاصل

لمدة طويلة و يستخدم فى حالة استخدام ورق ذو شرائط طويلة

(٥) Schleicher & Schuell 2043b

له نفس خواص ورق واتمان رقم (١)

(٦) Schleicher & Schuell 11598 c

و هو ورق ناعم و يستخدم اذا كان المطلوب ان يتم الفصل بسرعة

(٧) Schleicher & Schuell 112045 a&b

و هو ورق اليافه وصفاته ممتازة و يتم الفصل فيه ابطأ من النوع ٢٠٤٣
و لهذا فهو يعطى فصل حاد جدا ٠

المذيبات SOLVENTS

يحضر المذيب المناسب كما هو مذكور مع كل طريقة فى كل تجربة ، و ذلك بخلط مكوناته فى مخبار مدرج ، و يجب ان يكون المذيب او المذيبات المستخدمة على درجة كبيرة من النقاء ، و فيما يلى اهم خلطات المذيبات المستخدمة فى التحليل الكروماتوجرافى الورقى او الطبقة الرقيقة لفصل الاحماض الامينية :

(١) البيوتانول : حمض الخليك : الماء n-Butanol:Acetic acid: Water

و هى من اشهر خلطات المذيبات التى تستخدم كطور متحرك سواء عند الفصل

احادى التفريق ((الفصل فى اتجاه واحد) One-Dimension PC

او ثنائى التفريق (الفصل فى اتجاهين) Two-Dimension PC

و تتحرك الاحماض الامينية مع هذا الطور المتحرك بسرعات مختلفة تبعا للقاعدة التالية

الاحماض غير القطبية طويلة السلسلة (ذات سلسلة جانبية طويلة غير قطبية) و هى :

الليوسين ، الايزوليوسين ، الفينيل الانين ، التربتوفان
الفالين ، الميثايونين ، التيروزين

تتحرك بسرعة اكبر من قصيرة السلسلة غير القطبية مثل :

البرولين ، و الالانين ، الجلايسين

و اسرع من القطبية مثل : التربتوفان ، الجلوتاميك ، السيرين
الارجينين ، الاسبراتيك ، الهستدين
اللايسين ، السستائين

و النسب الشائعة لهذه الخلطة هى :

(أ) ٤ : ١ : ٥ بالحجم

و هى تؤدى الى فصل جيد جدا و نظيف لكل من :
السستين ، و اللايسين ، و الهستدين ، و الارجينين
و هى احماض امينية قطبية ، فى حالة الفصل فى اتجاه واحد
Farag et al,1981 و استعملت هذه النسبة للفصل فى اتجاهين
بواسطة Levy & Chung, 1953

(ب) ٤:١:١ بالحجم Hanes & Harris,1961

و هى تؤدى الى فصل جيد لكل من :

التيروزين ، الميثايونيـــن ، الفالين ، الفينيل الانين
و هى احماض امينية غير قطبية او قطبية متعادلة

(ج) ١٠٠ : ٢٢ : ٥٠ بالحجم : West, et al,1968

يستخدم فى التفريق فى اتجاهين و يعطى فصلا جيدا

(د) ٢٥ : ٦ : ٢٥ بالحجم : Harrow et al,1960

(٢) الفينول : الماء :

يستخدم غالبا فى حالة الفصل فى اتجاهين و النسب الشائعة له و هى صالحة للفصل الورقى او بالطبقة الرقيقة هى :

(أ) ٣ : ١ بالوزن Underwood & Rockland,1953 And Harborne,1984

(ب) ١٠٠ : ٣٩ بالوزن West, et al, 1968

(ج) ٧٥ : ٢٥ : ١ ايدروكسيد امونيوم مركز لعمل وسط قلوى
Underwood & Rockland,1953

(٣) الكلوروفورم : الميثانول : ٢ مولر ايدروكسيد الامونيوم بنسبة (٢:٢:١) بالحجم

(٤) m-cresol: Phenol بنسبة (١:١) مع ضبط درجة pH عند ٩٫٣ بالبورات

(٥) كولدين : ماء Harper et al,197

(٦) كولدين : ليوتيدين : مـاء كنسبة (٣ : ٣ : ٢)
Underwood& Rockland,1953 Collidine: Lutidine

(٧) ميثانول : ماء : بيريدين (٢٠ : ٥ : ١ بالحجم Redfield,1953
Methanol: Water: Pyridine

ويستخدم فى الفصل فى اتجاهين

(٨) تيرش‌بيتوانول : ميثيل ايثيل كيتون : مـاء : داى ايثيل امين كنسبة
(١٠ : ١٠ : ٥ : ١) Redfield, 1953
tert_butanol: methylethylketone:water: Diethylamine
ويستخدم فى الفصل ذو الاتجاهين مع المذيب السابق ذكره

(٩) بروبانول (طبيعى) : مـاء (٧٠ : ٣٠) n-propanol: water

(١٠) تيرش‌بيتانول : ماء : ٨٥٪ حمض‌فورميك (٦٩,٥ : ٢٩,٥ : ١)
tert-butanol: water: Fprmic acid (69.5:29.5: 1)
Underwood & Rockland, 1953

(١١) ميثيل كيتون : بيريدين : مـاء : حمض‌خليك (٧٠ : ١٥ : ١٥ : ٢)
Methylketone : pyridine: water: Acetic acid
Kipps,1972

(١٢) n-propanol: water:n-propylacetate:acetic acid:
Pyridine
كنسبة (١٢٠ : ٦٠ : ٢٠ : ٤ : ١) ويستخدم مع الطبقة الرقيقة مع السليلوز م ن — ٣ ، ومع الالكتروفورسيز فى اتجاهين كمذيب ثانى
(Kipps, 1972)

وضع العينة على الورقة SPOTTING

يستعمل سلك بلاتين ذو عقدة Loop قطرها ٤ر٠ مم لوضع محاليل المواد المراد فصل مكوناتها او يستعمل لذلك انابيب شعرية او ماصة دقيقة ولتنظيف السلك يغسل بالماء ثم يسخن على لهب بنزن لازالة املاح المعادن والمركبات العضوية ويجب الا يزيد قطر البقعة عن ٨ر٠ — ١ر٠ مم واذا اريد اضافة اكثر من نقطة من المحلول تترك البقعة لتجف ثم يكرر اضافة كميات منه بحيث تترك البقعة ما بين كل اضافتين متتاليتين ، ويمكن اسراع التجفيف بتوجيه تيار من الهواء البارد او الساخن الى مكان البقعة .

ويمكن استخدام " سشوار " مجفف الشعر لهذا الغرض
ويجب الا تزيد بقعة العينة عن نصف ميليميتر فى القطر والا يزيد حجم المحلول فيها عن ٥ ميكرولتر (٢ — ٥) ميكرولتر ، ويتراوح تركيز الاحماض الامينية فيها ما بين ٥ — ٢٥ ميكروجرام .

تجفيف الكروماتوجرام DRYING OF CHROMATOGRAM

عندما يصل الفصل الى الدرجة المطلوبة يجب ان تثبت المركبات المفصولة فى مواضعها التى وصلت اليها ، ويتم ذلك برفع الورقة التى تم عليها التفاصل (الكروماتوجرام Chromatogram) من التنك ويبخر المذيب بسرعة وذلك بتعليق الورقة بواسطة مشابك من الحديد الغير قابل للصدأ فى خزانة الغازات ويمرر تيار شديد من الهواء ولا ننسى ان نضع علامة على اقصى مسافة وصل اليها المذيب بواسطة القلم الرصاص .

الاظهار VISUALIZATION

ويستخدم لذلك محلول النتهيدرين ويحضر كالاتى :

٢٥ر٠ — ٥٠ر٠ ٪ ننهيدرين فى ٩٥ ٪ اسيتون فى الماء

او ٢٥ر٠ جرام من النتهيدرين فى ١٠٠ مل من البيوتانول المشبع بالماء ويستخدم على الاظهار على درجات حرارة ما بين ٨٠ — ١١٠ °م لمدة عدة دقـــائق .

وقد يذاب النتهيدرين فى محاليل منظمة اخرى كما فى استعمالة مع التحليل الاتوماتيكى فى اجهزة (AAA) كما سيأتى فى الفصل الخامس .

تعين قيمة R_f - VALUE

من اهم الخصائص الثابتة لكل مكون من مكونات المواد العضوية او بمعنى اشمل لكل مادة على حدها ، ويستعمد الكشف الوصفى لمكونات المواد العضوية فى العينات البيولوجية على تعيين قيمة (R_f) ويمكن قياسها فى كروماتوجرافيا الورق كالاتى : شكل (٢١) .

تقاس المسافة من خط البداية الى خط نهاية وصول المذيب الى اعلى الورقـــة ولتكن (أ) سم

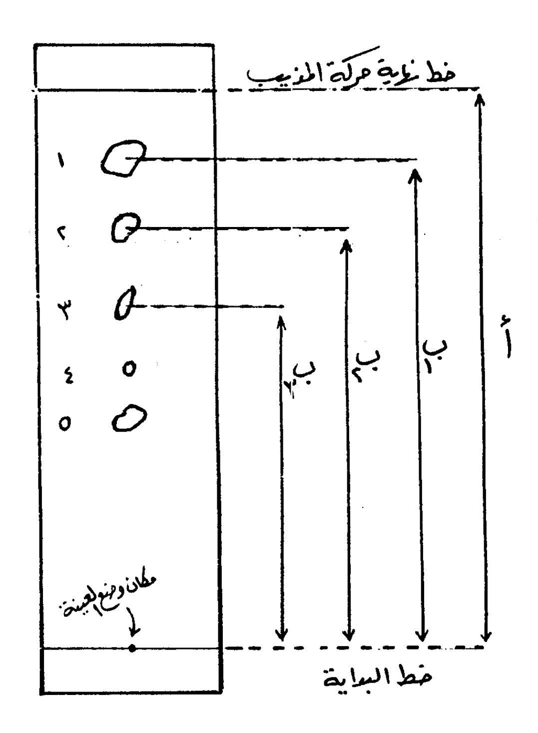
تقاس المسافة من خط البداية الى مركز كل بقعة ولتكن (ب) ويكرر ذلك مع كل مكون مفصول لحصول على ب١ ، ب٢ ، ب٣ ، ... وهكذا

تقدر قيمة (R_f) لكل مكون كنسبة لناتج قسمة (ب) على (أ)

$$R_{f1} = \frac{ب_1}{أ} \quad , \quad R_{f2} = \frac{ب_2}{أ}$$ ، ... وهكذا

ويتوقف مقدار (R_f) على عوامل كثيرة منها :

(١) درجة الحرارة التى اجريت عندها التجربة
(٢) نوع ورق الترشيح المستخدم



شكل (٢١): تقدير R_f على كروماتوجرام الورق

(٣) نوع المذيب (الطور المتحرك)

(٤) نوع المادة المختبـرة

(٥) حجم نقطة العينة ودقة العمل

(٦) نوع المذيب المذابه فيه العينة

ويلاحظ انه فى بعض الاحيان يستحيل قياس قيمة (R_f) وذلك فى الحالات التالية على سبيل المثال :

فى الفصل الكروماتوجرافى العمودى حيث لا يوجد خط بداية او خط نهاية
فى حالة التفاصل ثنائى التفريق حيث يصعب قياس مسافة تحرك المركب نتيجـة تداخل البقع فى كل مرحلة تفريق Developement
فى حالة ضرورة ترك المذيب ليمر من نهاية الورقة وبذلك يصعب قياس المسافة التى تحركها كل من المذيب والمادة لانها ستكون دائما طول شريط الورق

وفى الحالات التى يصعب فيها تقدير قيمة (R_f) يستعاض عنها بالمقارنة بين المخلوط ومخلوط قياسى ، او بتقدير ما يعرف ب (R_x)
والجدول ١٢ يبين قيم (R_f) للاحماض الامينية مع المذيبات المشهورة

تعين قيمة R_x

وهى قيمة تدل على التحرك النسبى لمركب ما ليست منسوبة لتحرك المذيب كما فى قيمة (R_f) ولكن منسوبة لحركة مركب قياسى اخر على نفس الورقة ، وتدل (x) على نوع المادة القياسية ، وعادة يستعاض عنها بالحرف الاول

جدول ــ ١٢ ارقام R_f مختلفة للاحماض الامينية مع مذيبات مختلفة

الاحماض الامينيـــــة	(١) $100 \times R_f$	(٢) $100 \times R_f$	(٣) $100 \times R_f$
الالانيـــــن	٦٢	٢٢	٢٩
الارجينيـــــن	٥٣	٦	١٩
حمض الاسبارتيك	٢٥	١٧	٦
حمض الجلوتاميك	٣٩	٢٤	١٠
الجلايســـــين	٤٩	١٨	٢٤
الهســـــتدين	٨١	٥	٣٢
الايزوليوســـــين	٨٥	٤٣	٤٩
الليوســـــين	٨٦	٤٤	٤٨
اللايســـــين	٤١	٣	٩
الميثايونيـــــن	٧٤	٣٥	٤٩
الفينيل الانيـــــن	٨٧	٤٣	٥٥
البروليـــــن	٨٧	١٤	٥٠
الســـــيرين	٣٣	١٨	٢٠
الثريونيـــــن	٥٧	٢٠	٢٦
التريتوفـــــان	٨١	٤٧	٦٣
التيروزيـــــن	٥٣	٤١	٤٧
الفاليـــــن	٨٢	٣٢	٤٠
السستاثيـــــن	ــ	١٠	٤
الاسبارجيـــن	ــ	١٤	ــ
الجلوتاميـــن	ــ	١٥	ــ

(١) مع البيتانول ، الماء ، حمض الخليك كنسبة ٢٥ : ٢٥ : ٦ على ٢٥°م لمدة ٣ ساعات
(٢) مع ن ــ بيتانول ، حمض الخليك ، الماء كنسبة ٤ : ١ : ١
(٣) مع الفينول و الماء بنسبة ٣ : ١ بالوزن

من اسم المركب القياسي ، وقيمة (R_x)

$$R_x = \frac{\text{المسافة التى يتحركها المركب من خط البداية}}{\text{المسافة التى يتحركها المركب القياسى من خط البداية}}$$

وفى بعض المراجع يستعاض عن الحرف (R) بالحرف (M) وعليه تسمى هذه القيمة بالنسبة للجلوكوز مثلا (R_G) او (M_G) وبالنسبة للحمض الامينى الالانين " R_A " او " M_A " .

التحرك الجزيئى (M_f) MOLECULAR FLOW

لوحظ ان قيمة (R_f) تزداد بزيادة الوزن الجزيئى فمثلا ترتيب الاحماض الامينية التالية يمثل نموزجا لذلك مقارنا بين الوزن الجزيئى و قيمة (R_f) جدول ١٣ .

وكلما زادت السلسلة طولا للحمض الامينى يميل لان يتحرك لمسافة اطول من المذيب العضوى ، ويتضح من شكل ٢٢ ان ارقام (R_f) للاحماض الامينية تقع على منحنى ، و هذا يدل بوضوح على وجود علاقة تناسبية بين (R_f) و الوزن الجزيئى .

و يمكن التعبير عن العلاقة بين الخواص المحبة للماء Hydrophillic والكارهة للماء Lipophillic كميا بتحرك الجزئ Molecular flow (M_f) .

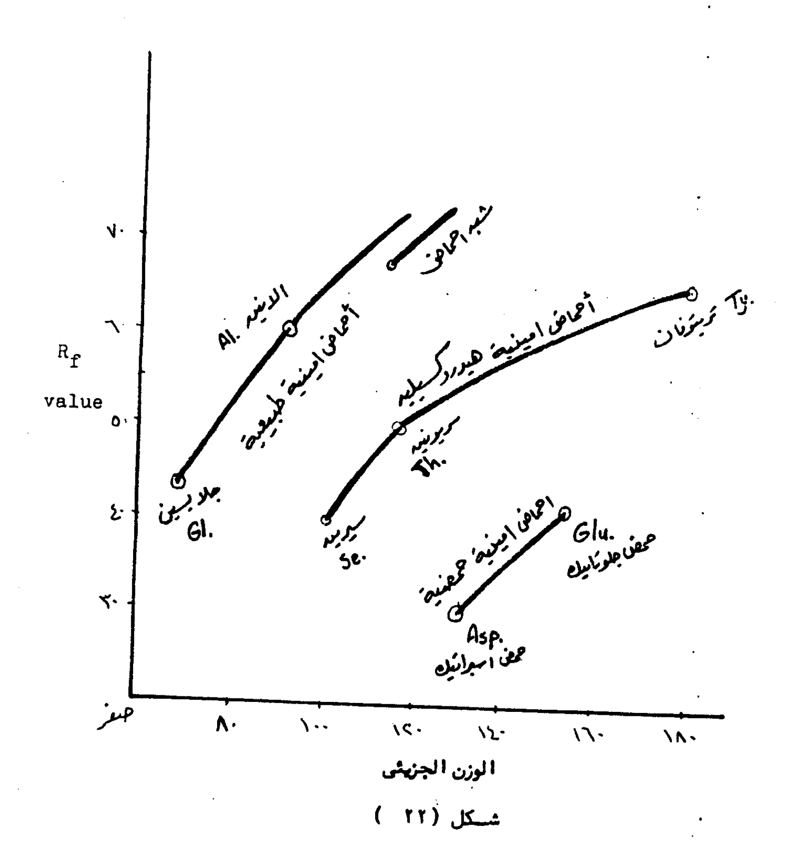
جدول (١٣)

الاوزان الجزيئية وقيم (R_f) لبعض الاحماض الامينية

الحمض الاميني	الوزن الجزيئي	R_f
الجلايسين	٧٥٫٠٧	٤٢
الالانين	٨٩٫٠٩	٥٩
الفالين	١١٧٫١٥	٧٥
الليوسين	١٣١٫١٣	٧٩

ويمكن حساب (M_f) من المعادلة التالية

$$M_F = \frac{\text{الوزن الجزيئي}}{R_f}$$



شكل (٢٢)

العلاقة بين الوزن الجزيئي للاحماض الامينية و قيمة R_f.

اولا : التفاصل الكروماتوجرافى الورقى احادى التفريق

ONE-DIMENSION PAPER CHROMATOGRAPHY

و يسمى ايضا التفاصل فى اتجاه واحد و يجرى بطريقتين كما سبق ذكره

(١) التفاصل الصاعد Ascending Developement

تقرب حافتى الورقة لتحويلها الى صورة اسطوانة و ذلك اذا كانت من النوع العريض المستخدم لاكثر من عينة فى وقت واحد و يراد وضعها فى تنك من النوع الاسطوانى ، اما اذا كانت رقيقة و تحتوى على عينة واحدة او كانت سوف توضع فى تنك من النوع المنشورى العريض فتبقى كما هى .

تغمس حافتها القريبة من العينة فى المذيب بحيث يصل مستوى المذيب فيها الى ما قبل خط البداية و يتحرك المذيب الى اعلى فى الورقة بالخاصية الشعرية و تتم عليها بعد ذلك نفس الاجراءات العامة السابق ذكرها .

(٢) التفاصل النازل Descending Developement

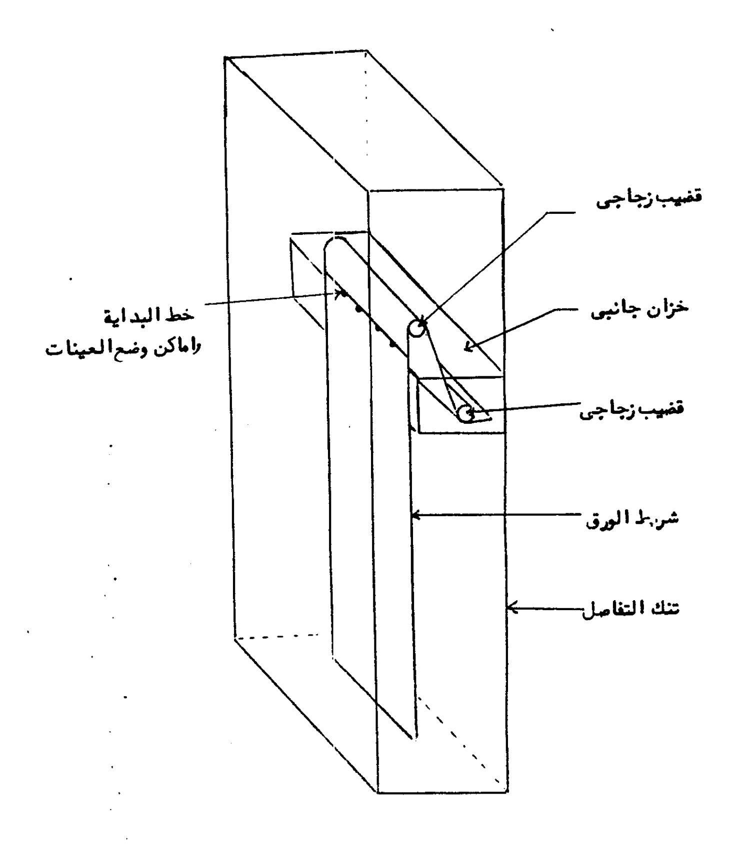
يوضع خزان جانبى Trough اعلى التنك Jar و تعلق ورقة او ورقتين كل ورقة على جانب واحد من الطرف القريب من خط البداية ، و تثبت الورقة

فى الخزان Trough بواسطة قضيب زجاجى Anchor rod و تمرر الورقة على قضيب زجاجى اخر Anti-syphon rod خارج و يرتفع قليلا عن الحافة لمنع استرجاع المذيب ، و يوضع المذيب باحتراس فى trough و يرتفع المذيب فى الورقة بواسطة الخاصية الشعرية و يمر فوق القضيب الزجاجى Anti-syphon rod ثم يسرى الى اسفل الورقة بواسطة الخاصية الشعرية و الجاذبية الارضية معا ، و فى خلال سريان المذيب يمر فوق خط البداية الذى يقع اسفل القضيب Anti-syphon rod و يعمل على فصل المحلول الى مكوناته المختلفة شكل ٢٣

و فى شكل (٢٤) مثالا لاستخدام هذا الاسلوب فى فصل الاحماض الامينية لاحد البروتينات .

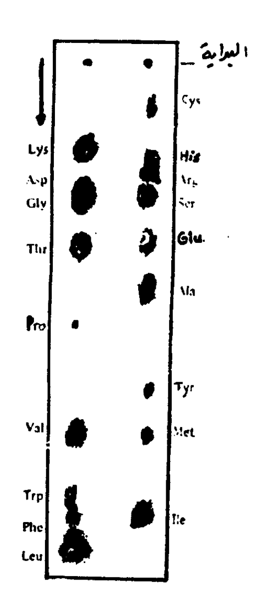
ثانيا : التفاصل الكروماتوجرافى الورقى ثنائى التفريق
TWO DIMENSION PAPER CHROMATOGRAPHY

و يسمى ايضا التفاصل فى اتجاهين و هو يستخدم فى حالة وجود عدد كبير من مكونات المادة المدروسة و خاصة عندما يكون بعض هذه المكونات ذات قيمة متقاربة فى (R_f) و يعتبر مخلوط الاحماض الامينية فى بروتين مهضوم مثال واضح لذلك الفصل فعند فصلها على ورق كروماتوجرافى فى اتجاه واحد و مهما كان نوع الطور المتحرك فان عدد من الاحماض الامينية فى كل مرة يقع متداخلا مع بعضه البعض و ان اختلف نوع الاحماض الامينية فى كل مرة مع كل مذيب او خليط من المذيبات فى كل مرة ، و للتغلب على هذه المشكلة اما ان نطيل مسافة التحرك و هذا يتطلب زيادة طول شريط الورق و فى هذه الحالة تتفلطح البقع ، و تضيع معالمها مع طول فترة الفصل و تقل دقة التحليل ، او ان يعاد فصل كل مجموعة متداخلة نتيجة اول تفاصل و ذلك باستخدام مخلوط اخر من المذيبات و لهذا يجرى عمل نوعين من التفاصل الاول فى احد Developement



شـــكل (٢٣)

طريقة التفاصل الورقى فى اتجاه واحد (نـــازل)



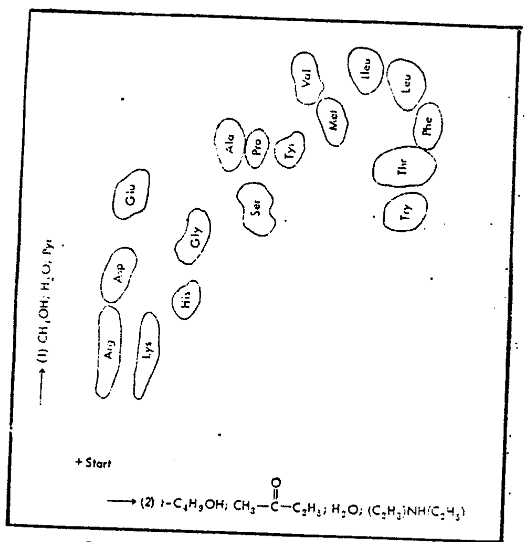
شكل (٢٤)

كروماتوجرام ورقي بعد الإظهار يوضح مواقع

الأحماض الأمينية في مخلوطين فيما بينهما

اتجاهات الورقة و يسمى التفاصل الاول first developement
و الثانى يكون فى الاتجاه العمودى عليه و يسمى التفاصـــــل الثـــانى
second developement و من هنا جاء اسمه تفاصل فى اتجاهين
two dimension or two ways
و يتم فى التفاصل الاول تفريق لمجموعات من الاحماض الامينية تكون متباعدة عن بعضها
بمسافات معقولة و لكن تحتوى كل مجموعة على عدد قليل من الاحماض الامينية المتقاربة
و فى التفاصل الثانى تتم مرحلة ثانية من التفريق بين هذه المجموعات الى افراد
مستقلة ، و من هنا كان اسمها ثنائية التفريق .

و طريقة اجراء هذا الاسلوب لا تختلف عن اسلوب التفاصل النازل الا فى كون
الشريط الواحد المربع المساحة لا يكفى الا لعينة واحدة توضع فى احد الاركان على
بعد حوالى ٣ سم من كلا الحافتين القريبتين و يرسم خط بالقلم الرصاص يمر بنقطة
العينة فى الاتجاهين المتعامدين ، و تطوى الورقة على شكل اسطوانة و تثبت بمشابك
من البلاستيك بحيث لا تتلاقى حوافها ثم تعلق فى التنك حتى تنغمس تحت سطح
المذيب الاول فى التنك كما فى طريقة التفاصل الصاعد ، و بعد تحرك المذيب
الى قرب نهاية الورقة تخرج الورقـــــــة من التنك و تجفف بسرعة بتيار هوائى
ساخن ثم يعاد طيها فى الاتجاه العمودى على اتجاه الطى الاول و يعاد وضعها
فى المذيب الاخر فى تنك اخر بنفس الطريقة السابقة ثم تجرى عليها بعد ذلك
نفس خطوات التحليل العادى شكل (٢٥) ،(٢٦) ،(٢٧) ، (٢٨) .



Reproduction of Two-Dimensional Paper Chromatographic Separation of Amino Acids.

شـــكل (٢٥)

نموزج حقيقى لمواقــع الاحماض الامينيــة على كروماتوجرام ورقى ثنائى التفريق باستخدام نوعين من خــــلائط المذيبــات العضــوية الموضـــحة .

شـــكل (٢٦)

نموزج لفصـــل الاحماض الامينيـــة باسلوب التفاصل ثنائى التفريـــــق

شـــكل (٢٧) كيفيـــة اجراء التفاصل فى اتجاهين

(١) قص الورقـــة و تحـــديد خطى البـــداية فى اتجاهيـــن متعامدين يتقاطعـــان فى نقطـــة و ضـــع العينـــة ٠

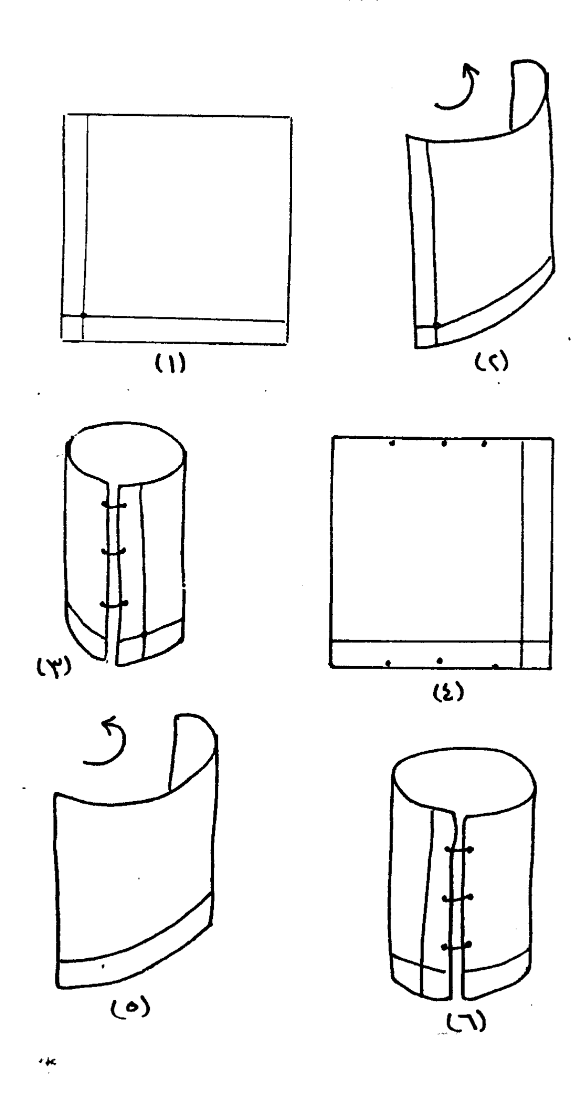
(٢) تثنى الورقـــة لعمل اســـطوانة ٠

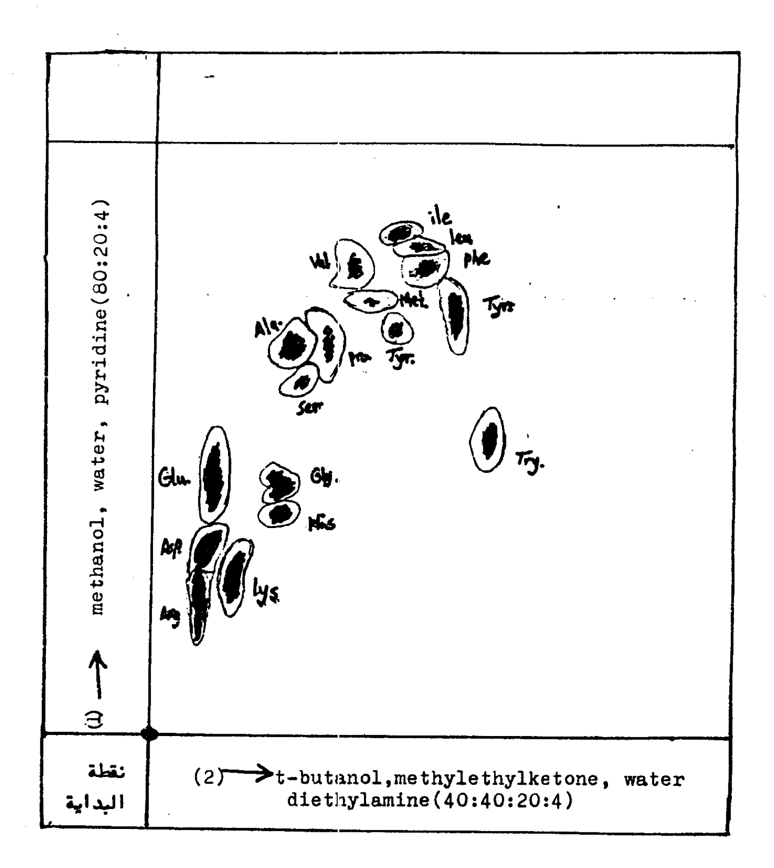
(٣) تثبت الورقـــة الاســـطوانية بمشابك بلاستيك

(٤) بعد التفاصـــل الاول تفرد ، و تجفف جيدا وبســـرعة

(٥) يعاد ثنها فى الاتجاه العمودى على الوضع الاول

(٦) تثبت الورقة الاسطوانية بمشابك بلاستيك


(١)
(٢)
(٣)
(٤)
(٥)
(٦)



شكل (٢٨)

كروماتوجرام عملى لعينة عليقة دواجن يمثل الاحماض الامينية التى ظهرت عليه

خطوات العمل لتقدير R_f للأحماض الامينية

(١) حضـر خمسة محاليل على النحو التالى :

(أ) ٤٠ ملجم من الايزوليوسين تذاب فى ١٠ مل من (١٠ ٪ ايزوبروبانول)
(ب) ٤٠ ملجم من الثريونيـن تذاب فى ١٠ مل من (١٠ ٪ ايزوبروبانول)
(ج) ٤٠ ملجم من الاسبارتيك تذاب فى ١٠ مل من (١٠ ٪ ايزوبروبانول)
(د) خليط من ٢ مل من كل من المحلولين السابقين
(هـ) ٤٠ ملجم من حمض امينى مجهول فى ١٠ مل من (ايزوبروبانول)

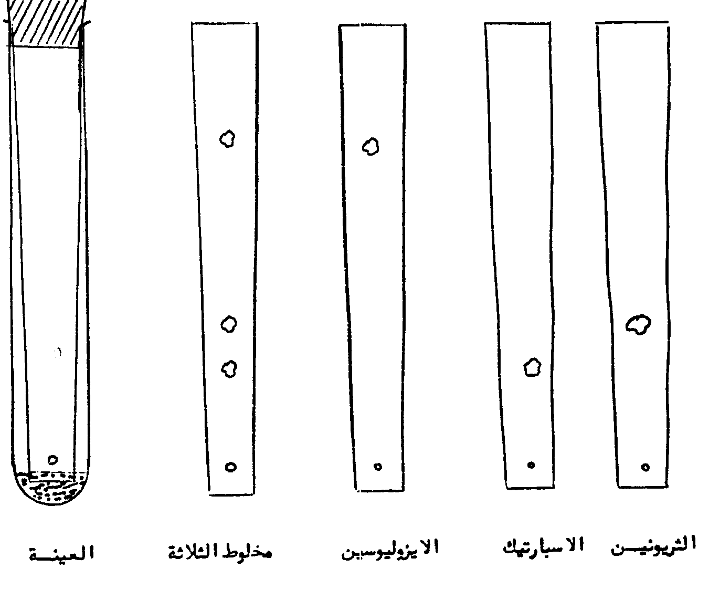
(٢) حضـر محلول النتهيدرين يذاب (٢٥٠ ملجم من النتهيدرين) فى ١٠٠ مل من الاسيتون (٩٥ ٪ استون فى المـاء) .

(٣) حضر محلول البيتانول حمض الخليك : باضافة ٢٥ مل من n-butanol الى ٢٥ مل من المـاء المقطر واخلطها جيدا ثم اضف اليها ٦ مل من حمض خليك ثلجى ، ويجب ان يكون المحلول محضر فى نفس وقت الاستعمال .

ويمكن الاستعاضة عن هذا المحلول بمحلول يتكون من ٢٥ مل ماء مقطـر + ٧٥ جرام فينول نقى ثم تدفىء المحلول حتى تمام الذوبان .

(٤) حضر ٥ شرايط من ورق ترشيح واتمان رقم (١) ذات ابعاد ١٣٫٥ × ١٫٨ × ٠٫١ سم كما فى شكل ٢٩ .

(٥) حضر خمسة انابيب اختبار بطول ١٥ سم واكتب على كل منها اسم محلول من المحاليل السابق تحضيرها فى خطوة (١) .



شكل (٢٩) تجربة عملية لتقدير R_f باسلوب مبسط

(٦) ارسم بالقلم الرصاص دائرة صغيرة قطرها ٥ر١ مم على بعد ٦ مم من طرف الورقة الضيق ٠

(٧) ضع بها ٥ ميكرولتر على الدائرة المرسومة بالقلم الرصاص على ورقة الترشيح (كل محلول على ورقة من الخمسة) على ان توضع على عدة مرات فى كل مرة يسمح لجزء يسير جدا من المحلول و يرفع بسرعة ثم تجفف البقعة بتيار هوائى ساخن (يمكن استخدام سشوار مجفف الشعر لهذا الغرض) ٠

(٨) ضع ٤ر٠ مل من محلول البيوتانول حمض الخليك في قاع كل انبوبة من الانابيب السابق اعدادها ، وضع ورقة الترشيح الخاصة بالحمض فيها واقفل السدادة جيدا مع ملاحظة الا تلامس الورقة جدار الانبوبة الا من اعلى عند السدادة .

(٩) انتظر ٢ — ٣ ساعات حتى يصل المذيب الى اقل من قمة الورقة بحوالي ٥ مم

(١٠) ارفع الورقة من انبوبة الاختبار بحرص وضع خط بالقلم الرصاص على خط وصول المذيب على الورقة وجفف على درجة ١١٠ °م لمدة ٣ دقائق.

(١١) رش الورقة بمحلول النينهيدرين وجفف على ١١٠ °م لمدة ٥ دقائق

(١٢) اخرج الورقات من الفرن تلاحظ تكون بقع زرقاء بنفسجية

احسب (R_f) لكل بقعة وهي تساوي

$$\frac{\text{المسافة من مركز البقعة الى مركز الدائرة الرصاص}}{\text{المسافة من خط نهاية حركة المذيب و مركز الدائرة الرصاص}}$$

قارن (R_f) لكل حمض من الاحماض الثلاثة منفردا و مع غيره وكذلك حاول تحديد نوع الحمض المجهول .

الفصل الكروماتوجرافى الورقى للأحماض الامينية

PAPER CHAROMATOGRAPHY

أولا : عملية الفصل SEPARATION

الادوات

١ ـ عدد ٢ جار اسطوانى خاص بالتحليل الكروماتوجرافى ارتفاعه ٢٠ سم
٢ ـ بخـاخة
٣ ـ ماصة ميكرومترية مقاس (صفر ـ ٥٠ ميكرومتر) او ماصة خاصة حجم ٢ ميكرولتر
٤ ـ ورق ترشيح واتمان (١) خاص بالفصل الكروماتوجرافى
٥ ـ قلم رصاص ذو سن مبرى جيدا
٦ ـ فرن تجفيف
٧ ـ اداه لاحداث تيار هواء ساخن (مجفف شعر " سشوار ")

المحاليل

(١) محلول النتهيدرين :

يذاب ٢٥٠ ملجم من النتهيدرين فى ١٠٠ من خليط من (٩٥ مل اسيتون و ٥ مل ماء مقطر) ويرج جيدا ويوضع فى البخاخة ٠

(٢) محلول المذيب رقم (١) :
===================

اخلط كل من :	٨٠ مل ميثانول	Methanol
	٢٠ مل ماء مقطـر	Water
	٤ مل بيريدين	Pyridine

(٣) محلول المذيب رقم (٢) :
==================

اخلط كل من :	٤٠ مل	tert-Butanol
	٤٠ مل	Methylethylketone
	٢٠ مل	Water
	٤ مل	Diethlamine

(٤) محلول العينة المهضومة :
=================

يعاد تخفيف العينة المهضومة بحيث يصبح تركيزها فيما بين ١ ـ ٢ جرام بروتين لكل ١٠٠ مل من المحلول ، وبحيث تحتوى الكمية التى توضع على ورقة الترشيح وحجمها ٢ ميكرولتر ما يوازى ٢٠ ـ ٤٠ ميكروجرام بروتين ٠

خطوات العمل

(١) اقطع قطعة من ورق ترشيح واتمان رقم ١ او ٢ ابعادها ١٧٫٥ × ١٧٫٥ سم ، وفى احد اركانها وعلى بعد ١٫٨ سم عن كل

حافة اصنع دائرة صغيرة بالقلم الرصاص قطرها ٥ر٠ — ٥ر١ مم ٠

(٢) انقل بواسطة الماصة الخاصة حجم ٢ — ٥ ميكرولتر من محلول العينة المهضومة على ان يتم ذلك فوق الدائرة الرصاص و بحيث لا تنتشر خارجها ، و يتم ذلك بوضع جزء صغير من الماصة ثم التجفيف بالمشوار حتى تجف ثم تكرر العمل حتى تمام نقل الحجم المطلوب و تمام جفافها ٠

(٣) توضع كمية مناسبة من المذيب (١) فى الجار الاول بارتفاع ١ سم

(٤) تلف الورقة لتصبح اسطوانه و تثبت على ذلك بدبوس او غيره فى قاعها و قمتها بحيث تكون علامة القلم الرصاص الى الخارج و تدلى بحرص فى الجار الاسطوانى و تعلق فى غطائه بحيث :

* لا تلمس جدران الجار و لا قاعه
* لا تنغمس علامة القلم الرصاص فى المذيب

(٥) تترك حتى يصل المذيب الى قرب الحافة العلوية لاسطوانة الورق و يستغرق هذا (١ — ٣) ساعات ، وعند ذلك يفتح الجار و تخرج الورقة و توضع علامة على خط المذيب العلوى و تترك لتجف فى الهواء الجوى ثم فى فرن تجفيف على درجة منخفضة (٦٠ درجة مئوية) ٠

(٦) توضع كمية مناسبة من المذيب (٢) فى الجار الثانى ، ثم تخرج الورقة و تفرد و يعاد لفها فى اتجاه عمودى على اللفة الاولى بحيث تكون علامة القلم الرصاص التى وضعت فيها العينة الى الخارج و الى اسفل ٠

(٧) يعاد تعليق الاسطوانة الورقية مرة اخرى فى الجار الثانى المحتوى على المذيب الثانى نفس الاحتياطات الخاصة بالجار الاول ٠

(٨) عند قرب وصول المذيب الى حافة الاسطوانة الورقية العلوية ، تخرج من

الجار و توضع علامة بالقلم الرصاص عند حافة المذيب على الورقة ثم تترك لتجف في الهواء الجوي ثم في فرن تجفف على درجة ١٠٠ °م لمدة ٣ دقائق.

(٩) ترش الاسطوانه برزاز من محلول النينهيدرين ثم توضع في فرن التجفيف على درجة ١٠٠ — ١١٠ °م لمدة ٥ — ١٠ دقائق ، حتى تظهر البقع البنفسجية .

(١٠) ترسم خطوط تمثل مربع منتظم بين علامة القلم الرصاص و التي وضعت عليها العينة و يمثل الخطين المارين بها خطي البداية ، و الخطان الماران بعلامات القلم الرصاص التي وصل اليهما المذيب الاول و الثاني و تمثلان خطي النهاية .

(١١) تحسب R_{f1} مع المذيب الاول و تساوي

$$\frac{\text{المسافة بين خط البداية و مركز دائرة كل بقعة}}{\text{المسافة بين خطي البداية و النهاية}}$$ و ذلك لكل بقعة

و تحسب R_{f2} مع المذيب الثاني بنفس الطريقة

الكشف الوصفي للأحماض الأمينية في العينة

النتيجة المتحصل عليها بالكروماتوجرام Chromatogram يمكن منها معرفة انواع الاحماض الامينية المفصولة و المواد المشابهة لها باحدى الطرق الثلاثة التالية :

(أ) مقارنة R_{f1} و R_{f2} لكل بقعة بجداول خاصة (ومن امثلة ذلك الجدول رقم ١٢ .

(ب) مقارنة الكروماتوجرام بكروماتوجرام قياسى نموزجى مثل الشكل رقم ٢٧

(جـ) مقارنة الكروماتوجرام بكروماتوجرام قياسى لخليط من الاحماض الامينية سبق اجراءه فى نفس الوقت مع العينة كما فى شكل ٢٨ .

التقدير الكمى للأحماض الامينية

QUANTITATIVE DETERMINATION

الادوات

١ — عدد من الانابيب الاختبار الصغيره الواسعة او الكؤوس سعة ١٠ مل
٢ — ماصـة ٢ مل
٣ — دوارق معيارية ١٠٠ مل و انابيب اختبار او اوعية عينات بغطاء
٤ — جهاز سبكتروفوتوميتر او فوتوميتر
٥ — مقص
٦ — قطـــارة

تحضير المحاليل

(١) تحضير المذيب القياسى :

(أ) محلول (سترات الصوديوم) المنظم Sodium citrate buffer

يضاف : ٦ر١٩ جرام Sodium citrate $2H_2O$

٥ر١٦ مل حمض هيدروكلوريك HCl

٠ر٢٠ مل Thiodiglycol

٠ر١ جرام Phenol

و يكمل بالماء المقطر الى ١ لتر

ملحوظة : المكون الثالث و الرابع يمكن الاستغناء عنها اذا لم يحفظ المحلول و استخدم مباشرة

(ب) فى حالة عدم توفر هذا المحلول يمكن استخدام محلول الفينول المشبع و يحضر باذابة ٧٥ جرام من الفينول النقى فى ٢٥ مل ماء مقطر .

(٢) تحضير المحاليل القياسية الاساسية للاحماض الامينية :

يذاب ٥٠ ملجم من كل حمض امينى فى حجم من المذيب القياسى السابق ذكره فى دورق معيارى ١٠٠ مل و يكمل الى العلامة .

يؤخذ ١ مل من هذا المحلول و ينقل الى دورق معيارى اخر ١٠٠ مل و يكمل

للعلامة ، و بذلك يكون كل ١ مل من المحلول الاساسى يحتوى على ٥ ميكروجرام من الحمض .

(٣) تحضير المحاليل القياسية المتدرجة :

لكل حمض امينى تحضر ٦ انابيب اختبار ، و يوضع فيها احجام متدرجة من المحلول القياسى الاساسى للحمض :

صفر ، ٢ر٠ ، ٤ر٠ ، ٦ر٠ ، ٨ر٠ ، ٠ر١ مل

و يضاف الى كل انبوبة من المذيب القياسى تكملة ٢ مل كالاتى :

٠ر٢ ، ٨ر١ ، ٦ر١ ، ٤ر١ ، ٢ر١ ، ٠ر١ مل

و يضاف الى كل انبوبة عدد ٢ نقطة من النثهيدرين باستعمال قطارة و توضع الانابيب فى فرن على درجة ١٠٠ °م لمدة ٣٠ دقيقة ثم تخرج و تبرد .

(٤) تحضير محاليل العينات :

تعد انابيب اختبار قصيرة واسعة او كؤوس ١٠ مل بعدد الا حماض الامينية المفصولة و يوضع فى كل منها ٢ مل من المذيب القياسى و عدد ٢ نقطة من النثهيدرين و تقص كل بقعة بحرص و عناية و توضع فى كأس منها و تذاب فيه حتى لا يبقى أى اثر لحدود البقعة على الورقة .

و توضع الانابيب او الكؤوس فى فرن تجفيف على درجة ١٠٠ °م لمدة ٢٠ دقيقة ثم تخرج و تبرد .

القياس

تقاس المحاليل القياسية لكل حمض على جهاز فوتوميتر او سبكتروفوتوميتر عند طول موجى ٥٧٠ نانومتر لجميع الاحماض الامينية ما عدا البرولين و الهيدروكسى برولين فيقاس عند طول موجى ٤٤٠ نا مع اعتبار المحلول الاول منها ضابط صفر التدريج ، و يرسم المنحنى القياسى له ، و تقاس محاليل العينات لكل حمض و تحسب التركيزات من المنحنيات القياسية ٠

الحجم (مل)	صفر	٢و	٤و	٦و	٨و	١,٠
التركيز (ميكروجرام)	صفر	١	٢	٣	٤	٥
القراءة	صفر					

تقدير الاحماض الامينية بكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

تعتبر احدث انواع التحليل الكروماتوجرافى ، و يجرى الفصل فيها بوضع طبقة رقيقة من المادة الادمصاصية على الواح من الزجاج ، و قد فاقت النتائج عند الفصل بهذه الطريقة فى كثير من الحالات لتلك التى اجريت بطريقة كروماتوجرافيا الورق ، حيث تصبح البقع اكثر اندماجا ووضوحا و بذلك تصبح عملية التفاصل اقصر و لا تحتاج الى وقت طويل .

الالواح PLATES

تستخدم الواح مسطحة من الزجاج العادى المستخدم فى النوافذ سمكه ٢٫٥ مم و تفضل منه احجام ثلاثة هى :

(١) ١٠ x ٢٠ سم
(٢) ٢٠ x ٢٠ سم
(٣) ٢٠ x ٣٠ سم

و يفضل الزجاج العادى عن الزجاج المصنفر و ذلك لسهولة التنظيف .

المواد الادمصاصية ADSORBANTS

المادة الشائعة الاستعمال فى كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة لتقدير الاحماض

الامينية هى السيلكا جيل ج silica gel G وهى عبارة عن مادة
مسامية ليس لها شكل بلورى معين كما يمكن استعمال السيللولوز او خلات السيللولوز .

اعداد الالواح والعجينة

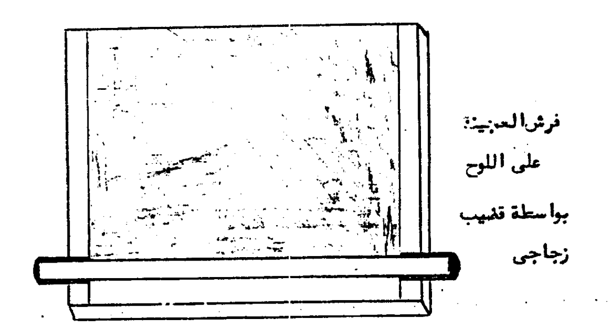
تعمل عجينة السيلكا جيل ١ : ٢ وزن فى حجم مع الماء ، ويكفى ٨
جرام فى ١٦ مل ماء لتغطية لوح ٢٠ x ٢٠ سم بطبقة سمكها ٢٥٠ ميكرون
اما عجينة السيللولوز م ن ٣٠٠ فيكون بنسبة ١ : ٥ وزن فى حجم ماء
و سيللولوز واتمان ٥ : ١١ وزن فى حجم من الماء .

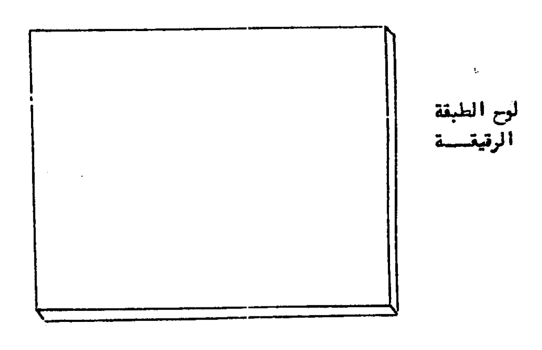
و تفرش العجينة على الالواح فورا شكل (٣٠ أ) ، و يتم الفرد بواسطة جهاز
خاص يضبط على السمك المطلوب ، و فى حالة عدم وجود الجهاز الخاص بالفرد
يمكن استعمال قضيب زجاجى بعد ادخال قطعة من المطاط (البولى اسيلين)
فى كلا طرفيه ذات سمك مناسب شكل (٣٠ ب) .

و تجفف الالواح بوضعها على سطح مستو لمدة ٣٠ دقيقة على الاقل فى درجة
حرارة الغرفة .

و يكون من المهم قبل بداية الفصل عمل اجرائين هامين على لوح الطبقة
الرقيقة وهما : (١) عمل تدريج دقيق لقياس المسافة على اللوح
(٢) عمل حفرة دقيقة لوضع قطرة دقيقة من العينة المهضومة

و يتم عمل التدريج باستخدام اداه معدنية او من البلاستيك مطبوع عليها
التدريج و الارقام بحروف بارزة او محفورة تسمى template و تضغط على حافة



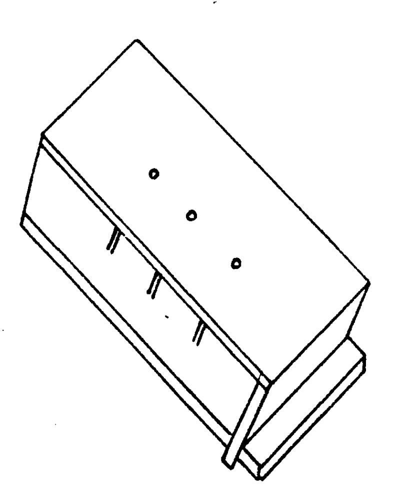


شـــــكل (٣٠)

فرش عجينة السيلكا على لوح الزجاج

اللوح فتطبع التدريج و الارقام محفورة او بارزة حسب نوعها ٠

بينما يتم عمل حفرة العينة باستخدام اداة اخرى تحتوى على انبوبة معدنية دقيقة مثبته على مسافة من حافة لها حاجز يمكن التحكم فيها (بمعنى زيادة المسافة بين الانبوبة و الحافة او تقليلها) شكل ٣١ ، و هناك ادوات منها يوجد بها عدد كبير من هذه الانابيب المتجاورة على ابعاد ثابته ، وعندما يراد عمل حفرة العينة او عدد من العينات على لوح الطبقة الرقيقة توضع اداة عمل الحفرة على لوح الطبقة الرقيقة بحيث تلاصق حافتها حافة اللوح ثم تضبط المسافة المراد وضع العينة عليها من حافة اللوح و يضغط عليها فتنغمر الانبوبة المعدنية الدقيقة او مجموعة الانابيب فى الطبقة الرقيقة صانعة حفرة صغيرة ٠



شكل (٣١) اداة لعمل حفرة للعينة على الطبقة الرقيقة من السيلكا

تنقل العينة اما على شكل خط يبعد مسافة معينة عن حافة اللوح بعد تدريج حافته او يوضع على شكل نقطة صغيرة جدا او عدة نقط صغيرة فى الحفرة او الحفر التى تم عملها فى الطبقة الرقيقة بالطريقة السابقة ٠

عملية التفاهل

DEVELOPEMENT

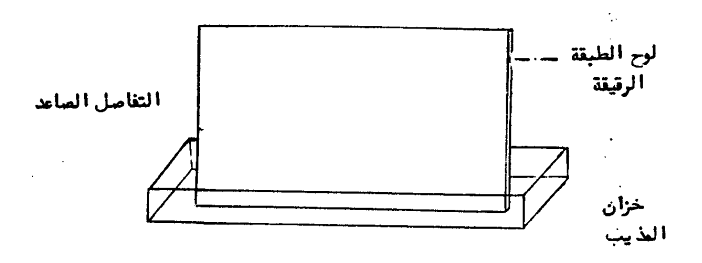
يقصد بعملية التفاصل Developement عملية تحرك الطور المتحرك على الطور الساكن وحدوث الفصل المطلوب للمخلوط المدروس على شكل بقع فى مواقع مختلفة على الطور الساكن ، ويتم ذلك بالنسبة لكروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة كما فى كروماتوجرافيا الورق بثلاثة اساليب هى : شكل (٣٢) ٠

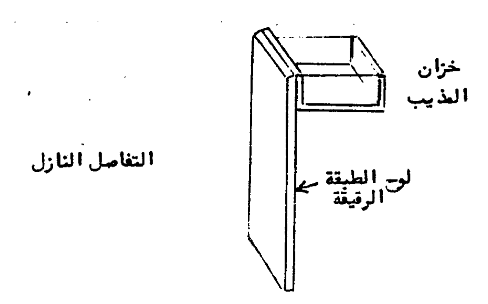
التفاصل النازل Descending developement

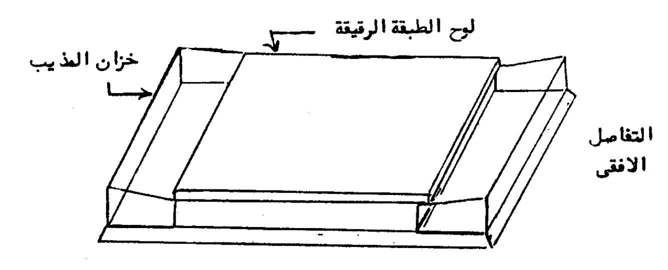
و فيه يتحرك الطور المتحرك على لوح الطبقة الرقيقة من اعلى الى اسفل و ذلك بفعل الجاذبية الارضية ، و فيه يوضع خزان المذيب فى اعلى اللوح ، و يوضع اللوح فى وضع رأسى بحيث تلاصق حافته العليا القريبة من مكان العينة ملاصقة لسطح الخزان ، او منغمسة فيه قليلا ، فيسيل المذيب خلال الطبقة الرقيقة الى اسفل بفعل الجاذبية الارضية ٠

التفاصل الصاعد Ascending development

و فيه يوضع اللوح المحتوى على الطبقة الرقية من ناحية حافته القريبة من حفرة







شكل (٣٢) طرق التفاصل الكروماتوجرافى
بالطبقة الرقيقة

العينة فى تنك (خزان) المذيب المحتوى على المذيب الى ارتفاع معين ،
بحيث ينغمر جزء صغير من اللوح فيه و بشرط عدم وصول سطح المذيب الى موقع
الحفرة (حفرة العينة) و يترك المذيب يتحرك الى اعلى فى الطبقة الرقيقة
حتى يصل الى قرب نهايتها بحوالى ١ - ٢ سم ثم ترفع من الخزان و تستغرق
هذه العملية حوالى ٣ ساعات ، و هذه الطريقة هى الاكثر شيوعا و الاكثر دقة و الاقل
مجهودا من الطريقة السابقة .

التفاصل الافقى (النائم) Horizontal developement

و هذه الطريقة غالبا ما تستعمل فى حالة استخدام تيار كهربى عالى الجهد
فى عملية التفاصل فيما يسمى Electrophoresis chromatography
و فيها يكون لوح الطبقة الرقيقة فى وضع افقى بحيث تلامس حافتيه سطحى السائل
فى خزانى الجهاز الموصلين بقطبى التيار الكهربى ، و يتحرك المذيب من جانب
الى اخر بتأثير فرق الجهد الكهربى بين الخزانين .

و تجرى بعد ذلك الخطوات المتبعة فى طريقة التقدير بكروماتوجرافيا الورق .

استخدام الطبقة الرقيقة THIN LAYER & والفصل بالالكتروفوريزيز ELECTROPHORESIS

و هو من افضل طرق الفصل للاحماض الامينية باستثناء طريقة الفصل الاتوماتيكى على اجهزة (AAA) وقد شرح هذه الطريقة كل من Blackburm, 1965 و Breleski & Turner, 1966 Harborne, 1984 و نتلخص فيما يلى كما ذكر

خطوات العمل

(١) يوضع حجم دقيق من العينة المهضومة بالقرب من احد الاركان على بعد حوالى ٢ ـ ٥ سم من الحافتين للوح (الطبقة الرقيقة) مع السيلولوز م ن ٣٠٠ والتى تحضر عجينتها مع الماء ١ : ٥ وزن من السيلولوز فى حجم من الماء بالترتيب ، و تجفف عند درجة حرارة الحجرة ، ثم توضع بقعة من صبغة كعلامة لحركة المذيب و يستعمل لذلك الثيونين " Thionin " Michrome dye No. 215

(٢) ترش اللوح بقليل من خليط منظم مكون من Formic acid Acetic acid عند pH ٢,٠ و يستخدم لذلك ورق واتمان ٣ م م Whatman 3 MM Paper ممسوكة بلوح الزجاج ٠

(٣) يجرى التفاصل بنفس المحلول المخلوط المنظم السابق ذكره عند ١٠٠٠ فولت

(١٠ ـ ٢٠ ميللى امبير) فى جهاز Shandon-cooled plate
electrophoresis لمدة ٢٥ ـ ٣٥ دقيقة (تتحرك العلامة
الصبغة لمسافة ٤ ـ ٥ سم ٠

(٤) يرفع اللوح و يجفف ثم يعاد غمره فى الماء المقطر عند درجة ٢٠ °م ثم يعاد
تفاصله على الجهاز ٢ ـ ٥ سم ثم يرفع و يعاد تجفيفه ٠

(٥) يعاد تفاصل اللوح مرتين بطريقة (TLC) كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة
فى اتجاهين و يكون المذيب الاول و لمدة ١ ـ ٥ ساعات هو:

و المذيب الثانى فى الاتجاه العمودى على الاول و لمدة ٤ ساعات هو

n-propanol:water:n-prpylacetate:acetic acid:pyridine
(120 : 60 : 20 : 4 : 1)

(٦) يرش بمحلول النتهيدرين و يفضل (Ninhydrin-Cadmium)
و يوضع فى فرن على درجة ١٠٠ °م لمدة ٥ دقائق ، يظهر شكل التفاصل
كما فى شكل ٣٣ ، و تجرى عليه اجراءات التقدير الكمى كما سبق ذكره فى
الكروماتوجرافيـــا الورقية ٠

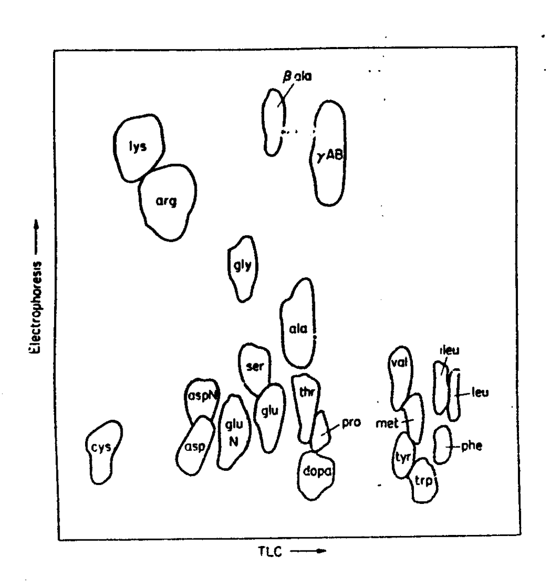
و يحضر Ninhydrin-Cadmium كما يلى :

يحضـــر محلول الاذابة كالاتى :

١ جرام خلات كادميوم Cadmium acetate فى ١٠٠ مل
ماء مقطـــر و تذاب جيدا و يضاف اليها ٠

٢٠ مل حمض خليك و ١ لتر اسيتون

يذاب ١ جرام ننهيدرين فى ١١٢ مل من محلول الاذابة السابق تحضيره ٠



شـكل (٣٣) صورة لفصل الاحماض الامينيـــة
بكـــل مـــن جهاز الالكتروفورسيز
والطبقـــة الرقيقـــة ٠

مراجع الفصل الرابع

Blackburn, S.(1965) Meth. Biochem. Anal. 13, 1

Breleski, R.L. and Turner, N.A.,(1966). Analyt. Biochem. 17: 278.

Farag, R. S., A.M. Youssef and H.Salem (1981). The distribution of some amino acids in hen's egg during incubation, Egypt, J. Anim. Prod. 21:Nc.(2): pp. 211-220.

Hanes,C.; C.K.Harris & M.A.Moscarella (1961) Can. J. Biochem. Pysicl. 39 : 163.

Harborne, J.B.(1984); Phytochemical Methods, A Guide to modern techniques of plant analysis.

Harper, H.A.; V.W.Rodwell and P.A.Mayes (1979) : "Review of physiclogical chemistry " Lange Medical Publications 17 th. Ed.

Harrow,B., E.Borek ; A.Mazur; G.C.F.Stone and H.Wagreich (1963): Laboratory manual of biochemistry. 1st.Ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia and London.

Kipps; A. (1972): Ph.D.Thesis. University of Durhan (cited in Harborne, 1984).

Levy & Chung, 1953 : Anal. Chem. Vol. 25: 396.

Redfield. Biochem. Biophys. Acta. 10,344 (1953) cited in"Hawk's physiological chemistry " 14th. Ed. the Blakiston Division, Mcgraw, Hill, Book Co. New, York. Published by Oser,B.L.(1965).

Underwood & Rockland: Food Res. 18, 17 (1953).

West,E.S.; W.P.Todd; H.S.Maon and J.T. Van Bruggen, 1968: Textbook of biochemistry , 4 th. Ed. ; The MacMillan, Co. New York.

$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$
$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$
$$$$$$$$

الفصل الخامس

تقدير الأحماض الامينية على أجهزة AAA

AMINO ACIDS DETERMINATION ON
AMINO ACID ANALYZER (AAA)

أولا : التحليلات الاتوماتيكية ونظرية الجهاز.
AUTOMATIC OPERTION & THRORY OF APARATUS

تحليل الاحماض الامينية يعتبر من طرق التحليل الصعبة و المكلفة فى معامل التحليل و هى فى الوقت نفسه واحدة من اهم تطبيقات الفصل الكروماتوجرافى بطريقة الاعمدة Column Chromatography Separation Technique
و من ناحية اخرى تعتبر عملية فصل الاحماض الامينية على اجهزة (A A A) احد تطبيقات كروماتوجرافيا التبادل الايونى ione-exchange - Chrom. التى طبقها لاول مرة Stein & Moore, 1948 -1954

و من ناحية ثالثة يعتبر تكنيك اجهزة A A A واحد من اهم تطبيقات اسلوب التحليل التلقائى (الاتوماتيكى) الذى طبقه لاول مرة فى تحليل الاحماض الامينية Spackman, Stein and Moore, 1958

و فى هذه الاجهزة تمرر عينة مخلوط الاحماض الامينية (او العينة المهضومة) خلال عمود من مادة راتنجية ثم تقدر المكونات المفصولة اتوماتيكيا ، وصفيا وكميا باسلوب قياس ضوئى عن طريق وحدة فوتومترية دقيقة Micr-Photometry
و تتلخص فكرة التحليل الاتوماتيكى فيما يلى :

التحكم فى المحاليل المنظمة FLOW RATE CONTROLING

تمثل هذه المحاليل الطور المتحرك فى التحليل (الفصل) الكروماتوجرافى العمودى حيث يتم امراره على عمود من حبيبات الراتنج وذلك عند درجات (pH) معينة حسب درجة التعادل الكهربى لكل حمض امينى على حدة ٠

او بمعنى اوضح فان امرار تيار من المحلول المنظم ذو درجة (pH) الخاصة يؤثر على الاحماض الامينية من حيث سرعة مرورها فيه بين حبيبات الراتنج حسب درجة التعادل الكهربى لكل حمض امينى على حده ٠

و بناء على تلك الفكرة يمكن تقسيم الاحماض الامينية الى ثلاثة اقسام تبعا لدرجة التعادل الكهربى لها (isoelectric pH) و ما يناسب كل قسم من المحاليل المنظمة (الطور المتحرك) جدول ١٤

و بناء على ذلك فيمكن تصور اسلوب الفصل بالجهاز المذكور على ضوء الفصل الورقى او الطبقة الرقيقة على اتجاهين حيث يعتمد على استخدام اكثر من مذيب ليزيد من تفاصل مواقع تحرك الاحماض الامينية عن بعضها ، و بدلا من تكرار المذيبات على الكروماتوجرام (الطور المتحرك) بشكل مكانى (معدل مكانى) بالتحريك فى اتجاهين على ورقة ذات مساحة معينة تجعله محكوما بطورين فقط

جدول : ١٤ :اقسام الاحماض الامينية التى تفصل تبعا لنوع المحلول المنظم و درجة تركيز الاس الايد روجينى .

القسم	الاحماض الامينيــــة	pH	المحلول المنظم
الاول	الاسبارتيك	٣ر٠	Buffer (A)
	الثيرونيــن	ـ	0.2 N (Sodium)
	السيرين	٥ر٧	pH 3.25, 10 min.
	الجلوتاميك	٣ر٢	Temp. 48 C°
	البرولين	٦ر٤	
الثانى	الجلايســين	٥ر٦	Buffer (B)
	الالانيــن	٦ر١	0.18 N (Sodium)
	السستين	٥ر٦	pH 4.25 , 30 min.
	الفاليـــن	٦ر٠	Tem.48 C°
	الميثايونيـــن	٥ر٨	
	الايزوليوسـين	٦ر٠	
	الليوسين	٦ر٠	
	التيروزيـــن	٥ر٧	
	الفينيل الانين	٥ر٩	
الثالث	الهستدين	٧ر٦	Buffer (C)
	اللايسين	٩ر٧	1.25 N (Sodium)
	الامونيـــا	ـ	pH 6.45, 55 min.
	الارجنيـــن	١٠ر٨	Temp. 70 C°

لوجود اتجاهين فقط للورقة او اللوح استخدم المعدل الزمانى فى معدل حركة تدفق المحلول خلال العمود و بذلك تمرر اكثر من طورين متحركين .

و هناك نظم للمحاليل المنظمة (الاطوار المتحركة) اما ثلاثة كما هو متبع فى النظام الذى سنتناوله تفصيلا فى هذا الفصل او اربعة فى نظام اخرى و ذلك بالاضافة الى محلول رابع او خامس يستخدم لغسيل العمود الراتنجى استعدادا للفصل الجديد .

تركيب المحاليل المنظمة المستخدمة فى نظم المحاليل الثلاث :
==================================

يوجد على الاقل نظامان لاجهزة القياس (AAA) من حيث عدد المحاليل المنظمة (الذيبات) " الطور المتحرك " اما ثلاثى و اما رباعى .

كما يوجد ايضا نظامان لهذه الاجهزة من حيث تركيبها الاساسى (القلوى الاساسى) اما الصوديوم او الليثيوم .

ضبط تدفق المحلول فى النسق التحليلى

من النقاط الهامة فى تصميم هذه الاجهزة التحكم الدقيق فى معدل تدفق (مرور) المحاليل المنظمة خلال الانابيب الشعرية الممتدة و الموصلة اجزاء الجهاز بعضها ببعض و بالتالى لمرور ثابت و منتظم مع الزمن خلال الهيكل المعقد لاجزاء الجهاز المعنية بعملية الفصل او القياس الضوئى .

و من ناحية اخرى فان معدل تدفق و حركة المنظم على عمود الراتنج له علاقة مباشرة فى عملية الفصل ذاتها حيث ان عملية الفصل تتوقف على الزمن اللازم لحدوث نقطة التعادل الكهربى للحمض مع منظم خاص و تقارن الاحماض الامينية مع بعضها على ضوء هذا الزمن و بالتالى فلابد ان يكون زمن المرور (معدل التدفق) طوال مدة القياس ثابتة ، حتى تكون المقارنة صحيحة ، و من ناحية اخرى فانها لابد و ان تكون ذات معدل معلوم بحيث يسمح مرور التيار خلال (الكويل) الجزء الخاص باظهار لون النتهيدرين بالزمن الكافى للاظهار •

و من ناحية اخرى فان معدل التدفق لابد و ان يسمح بحدوث فاصل معقول بين انطلاق و مرور كل حمض على حده بحيث يؤثر لونه مع النتهيدرين بشكل منفصل عن غيره فى جهاز القياس الضوئي و بالتالى تنفصل منحنيات القياس المسجلة بالمسجل على الورق اللوغاريتماتى انفصالا نقيا حتى يمكن حسابها بعد ذلك بدقة •

و يتم التحكم فى معدل التدفق بواسطة مضختين دقيقتين Micro-dosing pumps تعملان بشكل منظم يمكن التحكم فيه يدويا او من خلال وحدة البرمجة (المبرمج) Programmer فى الجهاز •

نظام الاحتفاظ بالنتهيدرين Ninhydrin storage system

يحفظ محلول النتهيدرين فى زجاجة سعة ٥ لتر و يسحب المحلول منها من خلال انبوبة متصلة بشبكة الانابيب عن طريق صمام تلقائى ، و لكى يظل محلول النتهيدرين تحت درجة منخفضة يمرر فيه سربنتينة (انبوبة ملتوية من الصلب الذى لا يصدأ Stainless steel) يمرر فيها تيار من الماء البارد متصل

خارج الجهاز بدورة تبريد مستقلة ٠

كما يمرر فى زجاجة محلول التنهيدريهن تيار من غاز (الازوت) من خلال انبوبة تفتح فى قاع الزجاجة متصلة بمصدر للازوت (اسطوانة ازوت) و ذلك لطرد الاكسجين منها و ضمان عزل المحلول عن الاكسجين ٠

النظام التلقائى لوضع العينة AUTOMATIC LOADER SAMPLE LOADING SYSTEM

يوجد نظامان لوضع العينة فى الجزء التلقائى و انطلاقها الى شبكة الانابيب

الاول : يدوى و فيه يحقن محلول العينة المهضومة (او محلول الاحماض الامينية) فى جزء من انبوبة شعرية ذات سعة ثابتة (١ مل) حيث تخرج الزيادة عن هذا الحجم المضبوط ، و هذه الانبوبة تفتح مفرغة عبوتها فى تيار المنظم يدويا عند ادارة مفتاح خاص ٠

الثانى : اتوماتيكيا و فيه تحقن اكثر من عينة فى مخزن العينات حيث تخزن كل عينة بحجم معلوم فى انبوبة مستقلة داخل المخزن و تفرغ محتوى كل عينة بالتتابع فى تيار المنظم بناء على تحكم من وحدة البرمجة بعد انتهاء تحليل العينة السابقة و اتمام غسل عمود الراتنج بالصودا و معادلتها ٠

حركة التفاصل على العمود DIMENSION OF THE SEPARATING COLUMN

تحيط بالعمود الراتنجى (عمود الفصل) انبوبة خارجية (جاكت)

يمر فيها تيار من الماء يمكن التحكم فى درجة حرارته بحيث يمكن من خلالها تسخينه اذا اريد الفصل على درجة حرارة عالية او تبريده اذا اريد الفصل على درجة حرارة اقل او باردة ٠

قياس الكثافة الضوئية *DETECTION SYSTEM*

بعد تكون اللون نتيجة اتحاد كل حمض امينى مع النتهيدرين يمرر المنظم حاملا اللون على وحدة قياس ضوئية حيث يتم قياس كثافتها الضوئية و يوجد فى الجهاز ثلاث وحدات متصلة بتيار المنظم بالتتابع اثنين ذوات فلتر يقيس عند طول موجى ٥٧٠ نانومتر لكى يتم فيه قياس اللون الازرق البنفسجى فيها بوضوح و الثالثة عند الطول الموجى ٤٤٠ نانومتر حتى يتم قياس اللون البنى الصفر فيها بوضوح و مواصفاتها كالتالى :

الوحدة	الطول الموجى المقاس Wave length (nM)	سمك مرور المحلول فيها Pathlength (mM)	اللون المقاس
١	٥٧٠	١٠	ازرق بنفسجى
٢	٥٧٠	٥	" "
٣	٤٤٠	١٠	بنى اصفر

و تستعمل لمبات التنجستن كمصادر ضوئية للخلايا الضوئية

التسجيل RECORDING

يوجد ثلاث مستقبلات كل منها من وحدة قياس ضوئية متصلة بسن حبر للتسجيل على ورق لوغاريتمى ، و يمكن التحكم فى معدل سرعة و حركة المسجل بناء على برنامج يمكن التحكم فيه بواسطة وحدة البرمجة .

ثانيا : اعداد وتحضير المحاليل.
PREPARATION OF SOLUTION

اختيار نظام المحاليل المنظمة
BUFFER SELECTING
[أطوار الفصل]

البروتينات الشائعة عند هضمها تحتوى غالبا على جميع الثمانية عشر او الواحد و عشرين حمضا امينيا الشائعة فى البروتينات ، و لهذه العينات يمكن اختيار نظام الصوديوم ثلاثى المنظمات Sodium three buffer system
اما السوائل الفسيولوجية حيث تحتوى العينة منها على جميع الاربعون او الخمسون مركب التي تعطى لونا مع النينهيدرين و التى توجد غالبا فى مخلوط التعبير الفسيولوجى فيمكن استخدام النظم الرباعية او الخماسية للمنظمات ، و يستخدم نظام الليثيوم فى حالة ما اذا كان من الضرورى فصل كل من اميدى حمضى الاسبارتيك و الجلوتاميك ، و هما الاسبراجين و الجلوتامين عن حمضيهما الاسبارتيك و الجلوتاميك كل على حده ، و فيما عدا هذه الحالة يعتبر نظام الصوديوم هو اكثر النظم استعمالا مع السوائل الفسيولوجية سواء بالنظام ثلاثى المنظمات او رباعى المنظمات .

و ان كان على وجه العموم يعتبر نظام الليثيوم اكثر دقة و حساسية من نظام الصوديوم و اذا اريد الحصول على تقدير منفصل لكل من الجلوامين و الاسبراجين عن الجلوتاميك و الاسبارتيك باستخدام نظام الفصل الصوديوم فيمكن ان نقسم العينة الى نصفين و يجرى الفصل على نصفها الاول قبل هضمها و على نصفها الثانى بعد هضمها .

تنقية مواد التفاعل

الاملاح المستعملة فى تركيب المحاليل المنظمة يجب ان تكون عالية النقاوة او فى اعلى درجة نقاوة ممكنه (AnalaR) ويجب ان يستعمل الماء المقطر مرتين او المنزوعة الايونات Deionized water .

والنتهيدرين قد يحتوى محلوله على كريات دقيقة غير ذائبة ووجود مثل هذه المعلقات فى محلولة تسبب خللا فى كفاءة وانتظام صمامات المضخة او حركة تدفق المنظم فى الشبكة ولذلك يجب ان يرشح المحلول بعد تحضيره .

وعموما يجب ترشيح جميع المحاليل المنظمة ومحاليل النتهيدرين والصودا الكاوية من خلال مرشحات دقيقة الثقوب Micropore filter سعة ثقوبها ٤٥ر٠ ميكرون شكل ٣٤ .

بعد الترشيح قبل الترشيح

شكل (٣٤) المرشحات الدقيقة قبل وبعد الترشيح

تقطير الماء

يجب ان يكون الماء المستخدم فى تحضير المحاليل عالى النقاوة خاليا من الشوائب او الايونات الاخرى ، حيث ان وجود اى ايونات فيه تؤدى الى ربط ايونات الراتنج فى عمود الفصل عند مرورها عليها ، ولذلك تجرى عليه قبل استخدامه عملية نزع الايونات بنظام مشابه اى يجب ان تربط الايونات القابلة للربط فى نازع ايونات الماء water deionilyzer

جو الحجرة

يفضل ان يكون جو الحجرة التى تتم فيها تحضير المحاليل والتى يوجد بها الجهاز محكمة الاغلاق ، مكيفة الهواء حتى يمكن تفادى وجود الامونيا والشوائب العالقة بالجو ، حيث ان الجو العادى فى المعامل يمكن ان يكون محتويا على قدر مؤثر من الامونيا التى تنطلق من التدخين او المنظفات المستعملة للارضية او من دورات المياه او بول حيوانات المعمل وغيرها .

اضافة مانع اكسدة الميثايونين :
===============

لمنع اكسدة الميثايونين يضاف Thiodiglycol

المذيبات العضوية

فى بعض الاحيان قد يستخدم مذيب عضوى يضاف الى المحلول المنظم (A) لسهولة فصل الثريونين و السيرين الا ان اضافة هذا المذيب الى المحلول (A) فقط يؤدى الى انخفاض خط البداية علو المسجل عند اتصاله من A الى B مما يؤدى الى حدوث اخطاء وعند حساب و تقييم المنحنيات لذلك يفضـــــل اضافته ايضا الى المحلول (B) ايضا ، و تضاف المذيبات العضوية فى حدود ٤ ٠/٠ حجم فى حجم ٠

و يختلف المذيب المناسب باختلاف نوع الراتنج المستعمل فى عامود الفصل و على سبيل المثال :

يستخدم البروبانول مع (راتنج ديورام) Durrum resin

و يستخدم 2-methoxyethanol مع الراتنجات الاخرى ٠

اضافة مانعات نمو الاحياء الدقيقة PRESERVATUVES

تضاف الى المحاليل المنظمة مواد مانعة لنمو الاحياء الدقيقة مثل :

الفينول ١ر ٠/٠ وزن فى حجم Phenol

بنتا كلوروفينول ١ر٠ مل / لتر Pentochlorophenol

حمض الكابريلك ١ر٠ مل / لتر Caprylic acid

مع ملاحظة ان الفينول قد يعطى المحلول لونا احمر نتيجة وجود بوليميرات فيه و تلك يمكن التخلص منها بالترشيح فائق الكثافة Ultra filtration

تحضير المحاليل المنظمة BUFFER PREPARATION

يجب بعد خلط و مزج مكونات المحاليل ان تضبط درجة الحموضة (pH) لها على جهاز pH-meter دقيق يعطى حساسية ٠٠١ر٠

و يجب ان تستخدم المواد الكيميائية بدرجة نقاوة لا تقل عن (AnalaR) درجة النقاوة الاولية ، و قبل تحضير المحاليل يجب غسل الاوانى الزجاجية المستخدمة فى التحضير للتخلص من الامونيا نهائيا و يمكن استخدام (BRIJ 35) على سبيل المثال كمنظف ، ثم الغسل بالماء ثم بالكحول و تقاس و تعاير المحاليل بالدوارق المعيارية و ليس بالمخابير ، و توزن الكيماويات بموازين دقيقة و تذاب فى ماء منزوع الايونات .

تحضير المحلول الحامل LOODING BUFFERS

و يستخدم هذا المحلول لاذابة العينة المهضومة او خليط الاحماض الامينية القياسية و يتركب كالاتى : جدول ١٥

و يوضح جدول (١٦) ، (١٧) ،(١٨) تركيب المحاليل المنظمة .

* و يستخدم فى ضبط (pH) للمحاليل السابقة كل من :
NaOH 50 % ، LiOH مشبع ، HCl مركز

و يكون تحضير القلويين طازجا .

جدول ــ ١٥ : تركيب المحلول الحامل

المكونـــــات	فى النظم الصوديومية	فى النظم الليثيومية
pH	2.15-2.20	2.15-2.20
Normality	0.2N	0.2N
Sodium citrate,$2H_2O$	19.6 gm.	-
Lithium Hydroxide,H_2O	-	12.6 gm
Conc. HCl	16.5 ml	24.0 ml
Thiodiglycol	20.0 ml	20.0 ml
Phenol	1 gm	1 gm
Water	to Liter	to Liter

جدول ــ ١٦ : تركيب المحلول المنظم فى نظام الصوديوم الثلاثى

	A	B	C	NaOH
pH	3.25	4.25	6.45	-
Normality(Na)	0.2	0.2	1.2	0.4
Sodium citrate$2H_2O$ (mg/L)	19.6	19.6	19.6	-
10.0N HCl(ml)	15	10	10	-
Thiodiglycol(ml)	5	5	-	-
Phenol (gm/litre)	1.0	1.0	1.0	-
Sodium Hydroxide (gm./L)	-	-	40.0	16.0
Water to	1 litre	1 litre	1 litre	1 lit.

جدول ـ ١٧ : تركيب المحاليـل المنظمة فى نظام الليثيوم الثلاثى

	Buffer A	Buffer B	Buffer C	LiOH
pH	2.60	2.94	3.53	-
Normality(Li)	0.235	0.600	1.700	0.3
Citric acid-H_2O(gm/L)	14.92	11.56	21.02	-
Lithium chloride(gm/L)	6.10	22.30	65.03	-
LiOH-H_2O (gm/L)	3.82	3.11	6.97	12.59
Phenol (gm/L)	1.0	1.0	0.5	-
Thiodiglycol(ml)	10	10	5	-
Water to	1 Litre	1 Litre	1 Litre	1 L.

جدول ـ ١٨ : تركيب المحاليل المنظمة فى نظام الليثيوم الرباعى

	Buffer A	Buffer B	Buffer C	Buffer D	LiOH
pH	2.60	3.025	2.940	3.53	-
Normality(Li)	0.235	0.320	0.600	1.700	0.3
Citric acid-H_2O gm/L	14.92	15.76	11.56	21.02	-
LiCl gm/L	6.10	9.07	22.30	65.03	-
LiOH-H_2O(gm/L)	3.82	4.48	3.11	6.97	12.59
Phenol(gm/L)	1.0	1.0	1.0	0.5	-
Thiodiglycol(ml)	10	10	10	5	-
Water to	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L

* بعد ضبط (pH) ترشح المحاليل بمرشحات فائقة اقطار ثقوبها ٤٧ر٠ ميكرون

* يمكن التخلص من الامونيــا اذا وجدت فى المحاليل المنظمة اما بامرارها على عمود فصل خاص ione-exchange
و اما بالغليان عند درجة (pH) عالية ٠

العوامل التى تؤثر على الفصل

(١) درجــة الحرارة :

تؤثر الحرارة على جودة الفصل بطريقتين :

(أ) بتغــيير pH

(ب) قابلية الحمض الامينى للارتباط او الانفلات من الراتنج

الفصل فيما بين الثريونين و السيرين يمكن تحسينها برفع درجة الحرارة ، و لكن فى نفس الوقت يتأثر حمض الجلوتاميك برفع درجة الحرارة ، و ترفع درجة الحرارة ما بين ٥٠ ـ ٧٠ °م فى حالة فصل العينات المهضومة لزيادة سرعة الفصل ، و لكن هذه الزيادة فى درجة الحرارة يجب ان تكون قبل فصل الايزوليوسين ، و الليوسين ، اما فى نظام الليثيوم و عند فصل السوائل الفسيولوجية ترفع الدرجة من ٦٠ ـ ٦٣ قبل فصل الليوسين و الايزوليوسين ٠

و فى الراتنجات الحديثة يمكن فصل الاسبارتيك و الهيدروكسى برولين ـ الثريونين ـ السيرين ـ الاسبارجين ـ الجلوتاميك ـ الجلوتامين ـ بدرجة حرارة قصوى ٣٧ ـ ٣٨ °م سواء بنظام الصوديوم او الليثيوم ٠

(٢) تركيز ايون الايدروجين :

درجة pH من العوامل الحرجة فى عملية الفصل فى اى نظام فصل ، وعموما جميع منحنيات القياس تبدو مبكرا واكثر حدة (مدببة او رفيعة القمة) فى حالة pH العالية جدا ، فى حين تكون متأخرة الظهور ومفلطحة فى المنخفضة جدا وبعض الاحماض الامينية تكون حساسة لدرجة الحموضة عن الاخرى .

(٣) المذيبات العضوية :

اذا اضيف اى مذيب عضوى الى المحلول المنظم الاول فان عامل الذوبان فى جميع الاحماض الامينية تتغير ، ولما كانت المركبات الاليفاتية تتأثر اكثر من الاحماض الامينية لذلك فان مجموعة الميثيل الزائدة فى الثريونين عن السيرين تجعلهما يختلفان فى الذوبان اكثر عند اضافة المذيب العضوى وبالتالى يكون الفصل بينهما افضل جودة .

والمذيبات العضوية التى يمكن استخدامها هى :

الميثانول ، الايثانول ، البروبانول ، الايزوبروبانول ، الميثيل سيلوسولف

Methanol, Ethanol, Propanol, isoPropanol,(2-methylethanol) methylcekkusolve

اذا استخدم الميثانول كمذيب عضوى فى هذه الطريقة فيجب ملاحظة ان حمض الجلوتاميك سوف يتحول الى الصورة الحلقية مكونا Pyrlidone carbonic acid

تخزين المحاليل المنظمة BUFFER STORAGE

يراعى ان تخلو المحاليل المنظمة من نمو الاحياء الدقيقة و يستخدم لذلك موانع نمو الاحياء الدقيقة مثل الفينول كما اسلفنا ، و مع ذلك فيجب ان لا تبقى المحاليل فى شبكة انابيب جهاز (A A A) عن اسبوعين على درجة حرارة الغرفـــة . و يمكن تخزين المحاليل على درجة ٤ °م لمدة اطول .

تحضير المحلول القياسى [محلول التعبير]

يحضر المحلول القياسى للاحماض الامينية من خليط منها على درجة Standard او كل منها على حدة على درجة نقاوة لا تقل عن Standard او باستخدام kitt خاصة بهذه الطريقة و تذاب فى المحلول الحامل السابق ذكره بحيث يكون تركيز الاحماض الامينية فيها بما يعادل ٥٠ نانومتر مول / مل .

و غالبا ما يستخدم مخلوط احماض امينية تنتج و تباع تجاريا لهذا الغرض على صورتين :

الاول : يناسب قياس البروتين المهضوم ، و يحتوى على الاحماض الامينية (١٧ حمض) هى جميع الاحماض الامينية الشائعة الواحد و العشرون فيما عدا اربعة هى (الجلوتامين و الاسبارجين و التربتوفان و السستائين) و ذلك بالاضافة الى الامونيــا ، و ذلك بتركيز ٢٫٥ ميكرومول / مل ، فيما عدا للسستين فيكون ١٫٢٥ مول / ١ مل .

الثانى : يناسب قياس السوائل الفسيولوجية و يتكون من عبوتين :

(أ) و تحتوى على ٢٥ ـ ٣٠ حمضا يعطى لونا مع النتهيدرين

(ب) و تحتوى على ١٠ ـ ١٤ قاعدة تعطى لونا مع اللنتهيدرين

و سبب اختفاء الاحماض الامينية الاربعة من مخلوط القياس السابق ذكره يرجع الـــى :

١ ـ بالنسبة للجلوتامين و الاسبارجين لانهما ينحلان الى الامونيـا و حمض الجلوتاميك و الاسبارتيك و بالتالى تتغير تركيزات المركبات الثلاث ، و لذلك يجب ان يحضر محلولا يوما بيوم •

٢ ـ بالنسبة للتريتوفان لانه لا يوجد فى مخلوط الهضم فى العينات المهضومة هضما حمضيا ، و بالتالى لا يوجد مع بقية الاحماض الامينـة فى مهضوم واحـــد •

٣ ـ بالنسبة للسستائين : لانه يقدر على صورة سستين

يخفف المخلوط القياسى خمسون مرة اى يؤخذ منه ١ مل فى دورق معيارى ٥٠ مل و يكمل الى العلامة بالمحلول الحامل ، و يحفظ فى درجة ـ ١٨ °م لحين الاستعمال •

و فى التحليلات الروتينية يمكن عمل منحنى قياسى واحد على الجهاز بمخلوط المعايرة السابق ذكره ، و يستخدم هذا المنحنى للتعبير للعينات كلها بعد ذلك و لا يكرر الا عند تغيير محلول النتهيدرين •

و يستحسن ان يجرى التقدير على الجهاز اولا باستخدام المخلوط القياسى ثم يجرى تقدير عينة عادية ثم يعاد تقدير المخلوط القياسى و يؤخذ متوسط

التقدير للمخلوط القياسي للحصول على دقة عالية للتعيير ٠

تحضير محلول العينة المهضومة

تحضر العينة المهضومة كما سبق ذكره في الفصل الثاني وذلك بحيث يحتوى المحلول النهائي عند الحقن على ما بين ٥ — ١٠ ملجرام بروتين / ١٠٠ مل ٠

تحضير محلول النتهيدرين

يحضر محلول النتهيدرين مباشرة في الزجاجة البنية ، حيث ترفع الزجاجة من مكانها في جهاز (A A A) ويسكب ما يمكن ان يكون متبقيا فيها ، وتغسل جيدا قبل التحضير الجديد ، يضاف اليها لاعطاء ٤ لتر من محلول النتهيدرين ما يلي :

١ — ٣٠٠٠ مل ميثيل سيلوسولف methyl cellusolve
او ٢٨٠٠ مل اثيلين جلاكول ethylene glycol
ثم يمرر غاز الازوت فيها لمدة ١٥ دقيقة ٠

٢ — يوقف تيار الازوت ويضاف ٨٠ جرام بالضبط من النتهيدرين باستعمال قمع وكأس ويغسلا بجزء من الذيب

٣ — يمرر قليل من الازوت حتى يذوب النتهيدرين ، اذا استعمل الميثيل سلوسولف يضاف ١ لتر من مخلوط الخلات المنظم واذا استعمل الاثيلين جلاكول يضاف ١٢٠٠ مل من محلول الخلات المنظم ٠

و يتكون محلول الخلات المنظم Sodium acetate buffer من

٥٤٤ جرام	Sodium acetate- $3H_2O$ (AR)
١٠٠ مل	Glacial acetic acid (AR)

و يكمل الى لتر بالماء المقطر مرتين او المنزوع الايونات

* ربما لا تذوب خلات الصوديوم فى الماء ولذلك يجب تسخينها قليلا قبل اضافة حمض الخليك الثلجى و يضبط pH على ٥ر١٥ باستعمال محلول صودا كاوية اذا لزم الامر و يرشح ٠

٤ — يترك الازوت يمر خلال المخلوط ١٥ دقيقة اخرى ٠

٥ — اضف اى من : ٦ر١ جرام من (ثنائى كلورور القصدير) $SnCl_2$-$2H_2O$

او ١٠ مل من ثالث كلوريد التيتانيوم ١٥ ٪ $TiCl_3$

و يفضل اذابة كلوريد القصدير فى قليل من الماء او ميثيل سيلوسولف قبل اضافتها ، ثم يرج الخليط جيدا ٠

٦ — فى حالة استخدام ثانى كلورور القصدير يكون المحلول جاهز للاستعمال بعد مرور ٢ — ٣ ساعات من التحضير ، اما فى حالة استخدام ثالث كلوريد التيتانيوم فيكون جاهز بعد نصف ساعة فقط من التحضير ٠

٧ — يملء الخط بين زجاجة النتهيدرين و المضخة بالمحلول الجديد و يضبط خط البداية Baseline على المسجل قبل عمل اى تحليل ٠

ثالثا : تركيب وأجزاء جهاز AAA

PHYSICAL DESCRIPTION

يتركب الجهاز كما فى الشكل التخطيطى شكل (٣٥) والتفصيلى (٣٦) من الاجزاء الرئيسية التالية :

١- زجاجات المحاليل

BUFFER STORAGE

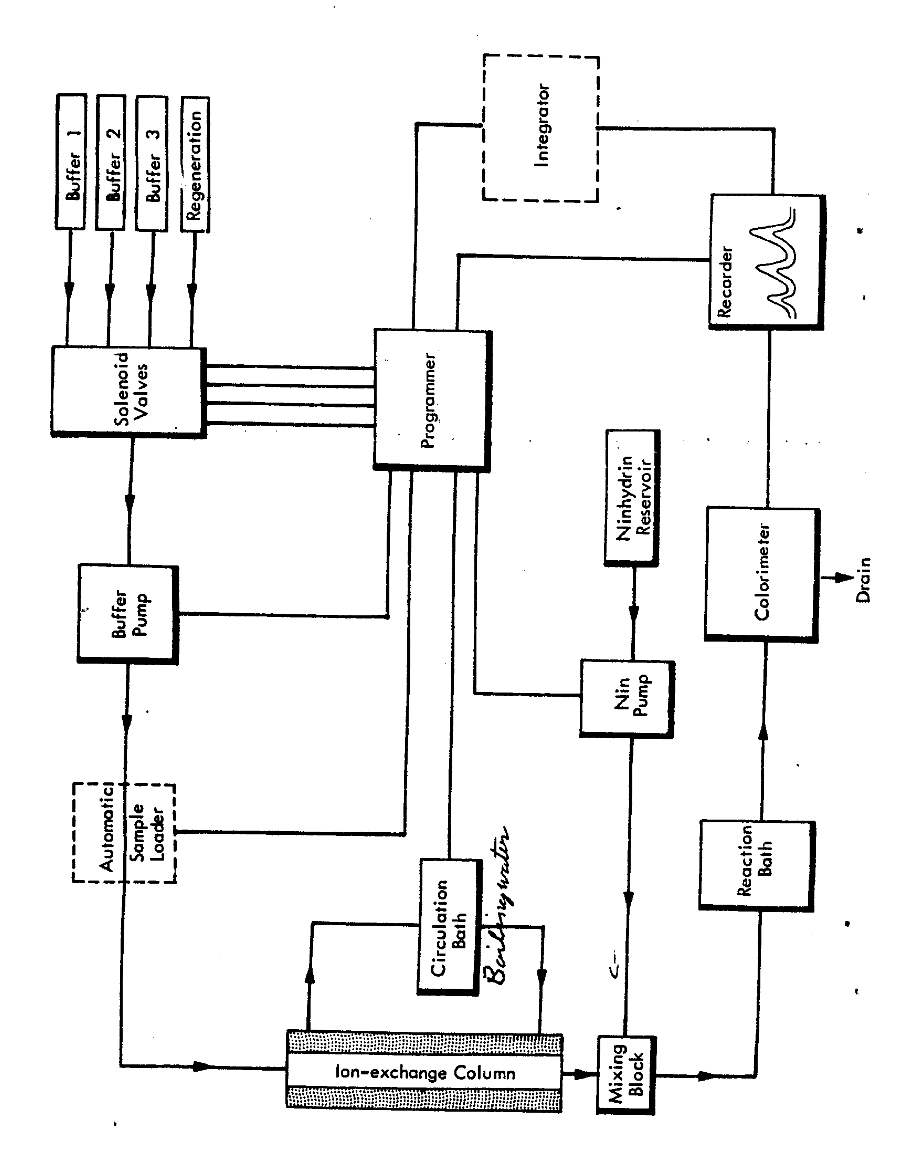
و هى كما فى شكل (٣٧) خمسة زجاجات : احدهما بنية سعة ٥ لتر للننهيدرين و سوف نتحدث عنها فيما بعد و الاربعة الباقيـة هى :

١ ـ سعة ٥ لتر بيضاء للمحلول المنظم رقم (A)
٢ ـ سعة ٣ لتر بيضـاء للمحلول المنظم رقم (B)
٣ ـ سعة ٥ لتر بيضاء للمحلول المنظم رقم (C)
٤ ـ سعة ٢ لتر بيضاء لمحلول الغسيل وتحوى الصودا الكاوية .

و تغطى كل زجاجة بسدادة ينفذ منها انبوبة تصل الى قاع الزجاجة و توصل الى الصمامات الدوارة .

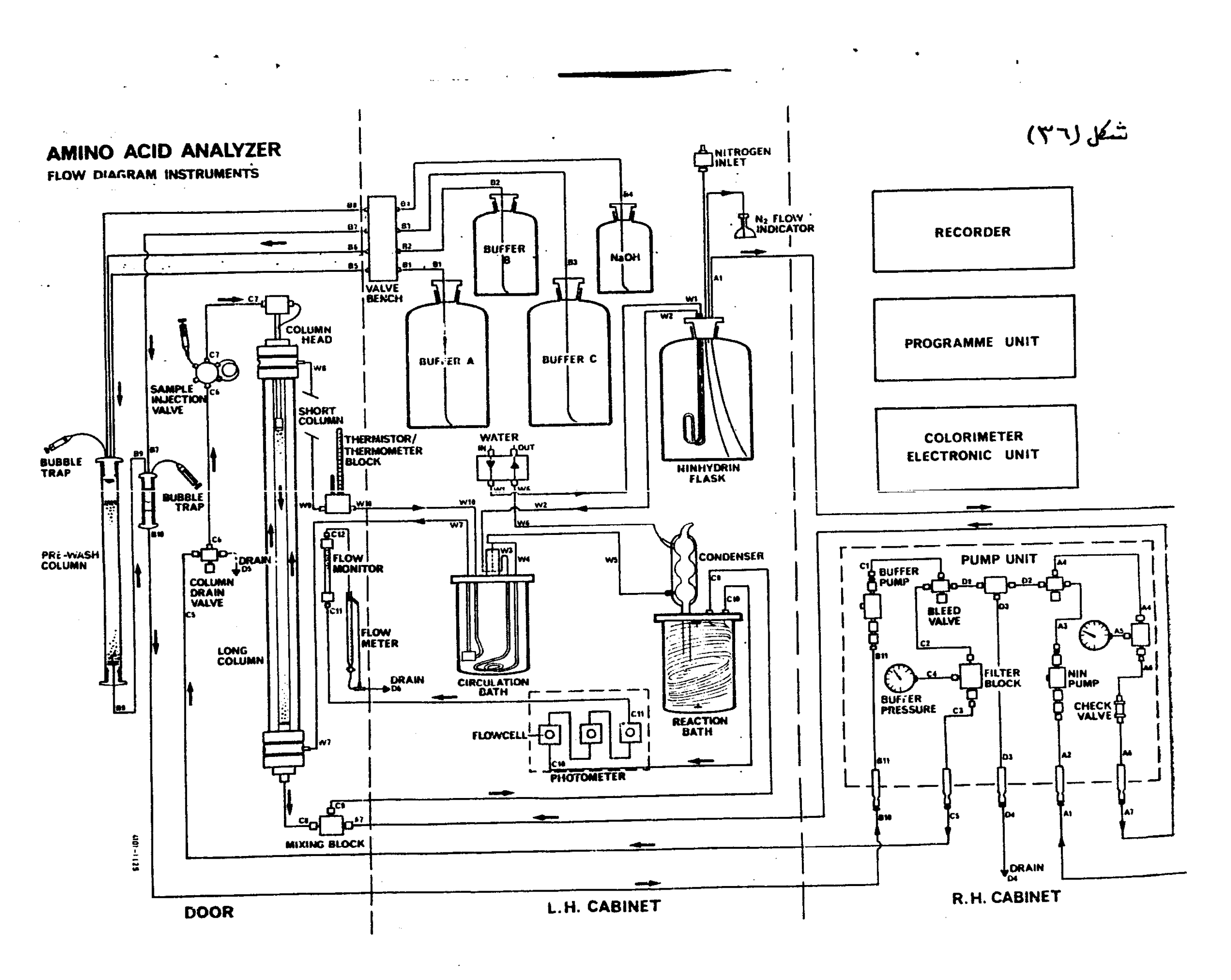
٢- انابيب الوصيل

تعتبر فكرة التحليلات الاتوماتيكية عموما مبنية على اساس مرور السائل المتفاعل خلال انابيب رفيعة فى معدل زمنى ثابت ، و يعتبر جهاز (AAA) هو خط من

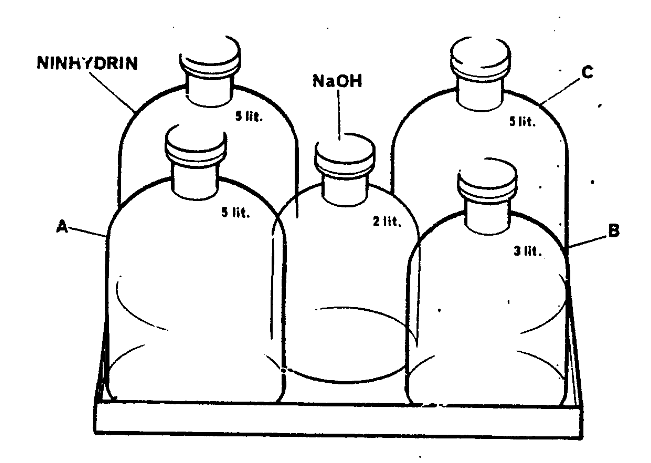


شكل (٣٥) شكل تخطيطي لاهم اجزاء جهاز AAA

شكل (٣٦)



AMINO ACID ANALYZER
FLOW DIAGRAM INSTRUMENTS
RECORDER
PROGRAMME UNIT
COLORIMETER ELECTRONIC UNIT
NITROGEN INLET
N_2 FLOW INDICATOR
VALVE BENCH
BUFFER A
BUFFER B
BUFFER C
NaOH
NINHYDRIN FLASK
WATER
IN
OUT
COLUMN HEAD
SHORT COLUMN
THERMISTOR/ THERMOMETER BLOCK
SAMPLE INJECTION VALVE
BUBBLE TRAP
BUBBLE TRAP
PRE-WASH COLUMN
COLUMN DRAIN VALVE
DRAIN
LONG COLUMN
FLOW MONITOR
FLOW METER
DRAIN
CIRCULATION BATH
CONDENSER
REACTION BATH
FLOWCELL
PHOTOMETER
MIXING BLOCK
PUMP UNIT
BUFFER PUMP
BLEED VALVE
FILTER BLOCK
BUFFER PRESSURE
NIN PUMP
CHECK VALVE
DRAIN
DOOR
L.H. CABINET
R.H. CABINET



شكل (٣٧) زجاجات المحاليل المنظمـــة

الانابيب الرفيعة التى توصل اجزاء الجهاز ببعضها ٠

وجميع انابيب التوصيل الموصلة من المحاليل و النتهيدرين من نوع (PTFE)
و هي على قطرين :

الاول : قطر داخلى ٥ر١ مم وخارجى ٣ مم ويوجد فى توصيلات المحليل المنظمة الى صمامات العينة و من النتهيدرين الى صندوق الخلط و الوصلة من الفوتوميتر الى الخارج (للصرف) ٠

والثانى : قطر داخلى ٧ر٠ وخارجى ٢ مم ما بين صمام العينة حتى نهاية الفوتوميتر ، وجميعها يتحمل ضغط (٥٠ ضغط جوى) ٠

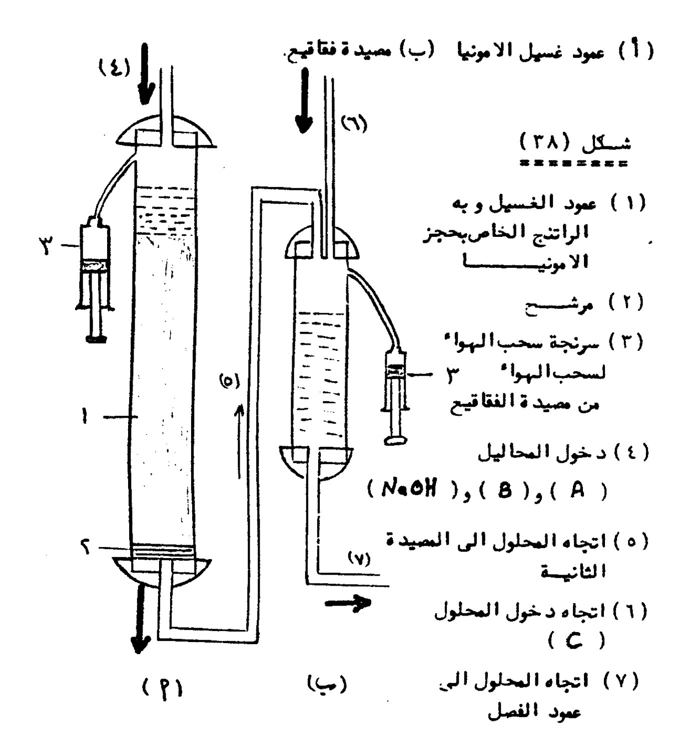
و يوجد نوع اخر من انابيب التوصيل من نوع (PVC) قطر ٨ مم يستعمل لحمل تيار الماء الساخن او البارد سواء فى دورة تنظيم حرارة عمود الفصل او تبريد التنهيد رين فى زجاجته ٠

٣- الصمامات الدوارة SOLENOID VALVES

اربعة صمامات تعمل اتوماتكيا باشارة من وحدة البرمجة ، بحيث تسمح بمرور المحلول المطلوب فقط فى الزمن المناسب ، و يتحكم كل صمام منها فى مرور المنظم (A) و (B) و (C) و (NaOH) ٠

٤- مصايد الفقاعات BUBBLE TRAPS

و يجب ملاحظة عدم وجود اى فقاعات فى تيار تدفق المحلول ، لذلك يحتاط للتخلص من هذه الفقاعات بواسطة مصايد Bubble traps و يوجد منها اثنين قبل مضخة المنظم ، احداهما فى قمة عمود الغسيل و الاخرى بعده ، و الاولى لاقتناص الفقاعات القادمة من محلول (A) و (B) و (NaOH) و الثانية لاقتناص الفقاعات من المحلول (C) او من عمود الغسيل شكل (٣٨) ٠
و مركب على كل مصيدة سرنجة بلاستيك لسحب الهواء المتجمع فى المصيدة ٠



٥- عمود الغسيل

PRE-WASH COLUMN

و هو عمود عبارة عن انبوبة زجاجية تحتوى على راتنج يعمل على امتصاص الامونيا التى يمكن ان تتكون فى المنظمات (A) ، (B) وعند غسيل الجهاز فى نهاية الفصل يمر ايدروكسيد الصوديوم عليها فيطلقها (يحررها) منه الى الخارج ٠

٦- مضخة المنظم

BUFFER PUMP

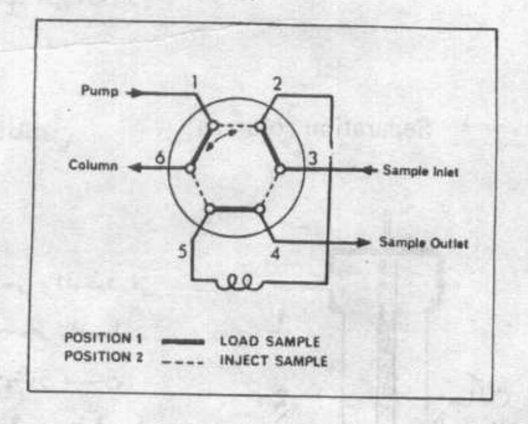
و هى اهم جزء فى التحليل الاتوماتيكى ، و هى عبارة عن مضخة دقيقة تعمل على دفع المحلول المار فيها بمعدل ثابت طول وقت التحليل و هى تدفع المحلول الى صمام ثلاثى Bleed valves يمكن التحكم فيه يدويا او اتوماتيكيـــا من وحدة البرمجة ، و هو اما ان يوجه المحلول الى الصرف الخارجى او الى بقية الجهاز حيث يمر على مرشح (فلتر) دقيق لترشيح المحلول قبل دفعه الى بقية الاجـزاء .

و يمكن التحكم فى ضغط المحلول داخل الانابيب بسرعة او ابطاء المضخة ، و يظهر ضغط المحلول داخل انابيب الجهاز من خلال عداد ذو مؤشـر .

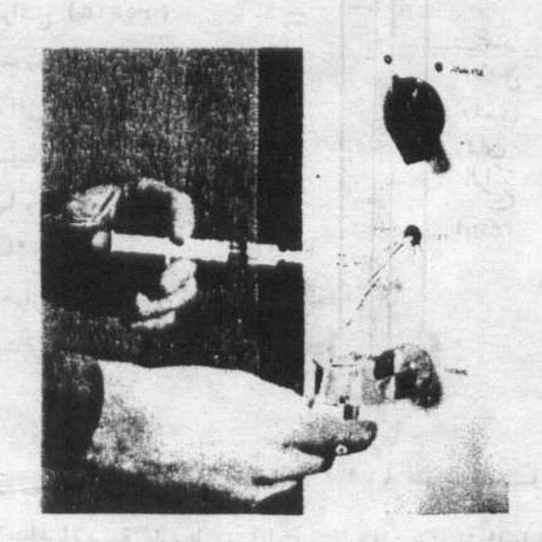
٧- صمام حامل العينة

SAMPLE LOADING VALVE

و هو يعمل يدويا او اتوماتيكيا ، و هو عبارة عن انبوبة ذات حجم ثابت تمتلىء بمحلول العينة فتسع حجما ثابتا قدره ١ مل و فى حالة استعمال وحدة البرمجة لتحليل اكثر من عينة يسمح هذا النظام بملىء عدد من الانابيب كل منها بعينة و يسمح بمرورها فى الجهاز اتوماتيكيا بناء على اشارة وحدة البرمجة بعد انتهاء العينة السابقة و يتكون هذا الصمام كما فى شكل (٣٩) ، (٤٠) . من قرص به فتحتان احداهن قادمة من المضخة و الثانية مؤدية الى عمود الفصل و عند ادارة قرص الصمام فى وضع عدم العمل حيث تكون العينة مخزنة فى انبوبتها Sample loop يمر المحلول من فتحة المضخة الى انبوبة فى الصمام ليمر بهـــا



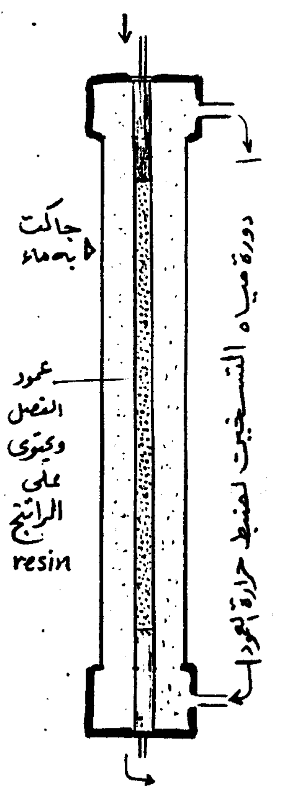
شكل (٣٩)



شكل (٤٠) كيفية وضع العينة

ليسبها عينة ثم الى العمود ، و عند وضع العمل يحرك القرص تتطابق فتحتى المضخة و العمود مع فتحتى طرفى الانبوبة (sample loop) فتندفع العينة فى طريقها الى العمود ٠

٨- عمود الفصل Separation columns



شكل (٤١) عمود الفصل

و هو الجزء الاساسى و الوحيد فى كل اجزاء الجهاز المتخصص للفصل الكروماتوجرافى ، حيث يتكون من انبوبة زجاجية قطرها ٩ مم و طولها ٧٢,٥ سم مثبتة راسيا فى الجهاز و تحتوى على الراتنج (resin) و يوجد فى طرفيها مرشح يمر المحلول الحامل للعينة من اعلاه الى اسفله و يغلفها من الخارج انبوبة زجاجية اخرى واسعة يمر فيها (بينها و بين العمود) تيار من الماء الذى يمكن التحكم فى درجة حرارته حسب اشارة تأتى من وحدة البرمجة كما فى شكل (٤١) ٠

و يخرج المحلول منه بعد حدوث عملية التفاصل و تتوزع الاحماض الامينية عليه على مسافات متتالية الى صندوق الخلط٠

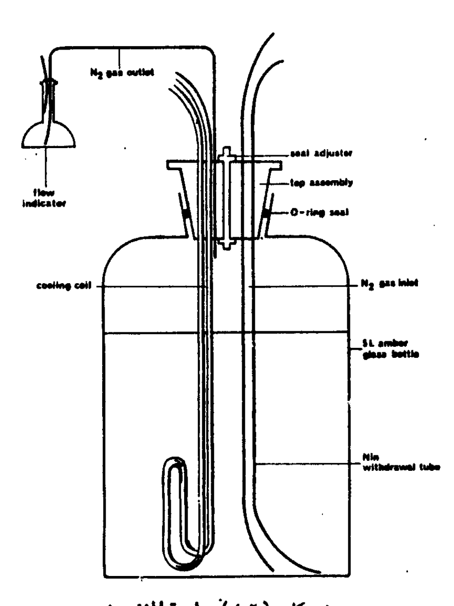
٩- زجاجة النهيدرين

NINHYDRIN STORAGE SYSTEM

زجاجة بنية سعة ٥ لتر تحتوى على محلول النيهيدرين السابق تحضيره و هى ذات فوهة واسعة ذات غطاء ينفذ منه خمسة انابيب كما هو موضح بالشكل (٤٢)

(١) احدهما لسحب محلول النيهيدرين الى المضخة

(٢) الثانية لدخول تيار غاز الازوت متصلة بمصدر للازوت النقى ، عبارة عن

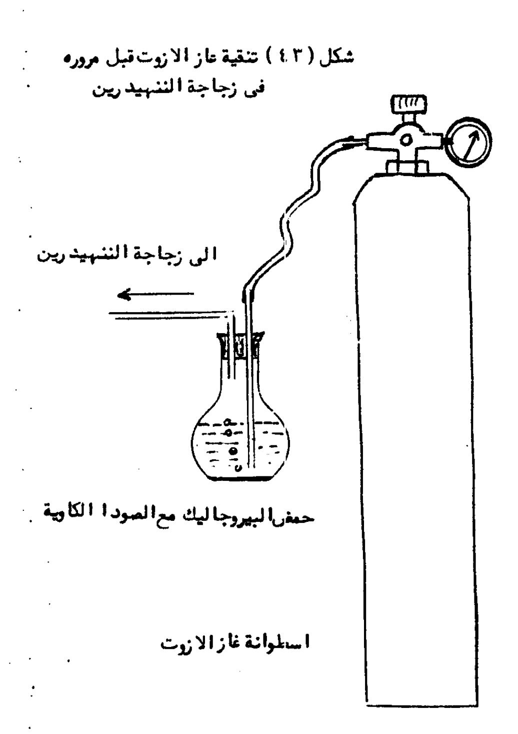


شكل (٤٢) زجاجة النيهيدرين

اسطوانة غاز الازوت مركب عليها منظم و منقى عبارة عن دورق محكم الغطاء ، شكل (٤٣) يحتوى على Pyrogallic acid فى ايدروكسيد صوديوم ٤ عيارى وذلك لامتصاص ما عسى ان يكون بغاز الازوت من الامونيا .

الثالث: انبوبة لخروج الازوت بعد مروره فى النتهيدرين و هذه الانبوبة تغمس فى وعاء يحتوى على قليل من الماء لاظهار معدل مرور غاز الازوت فى النتهيدرين .

و الرابع و الخامس: لدخول و خروج انبوبة من الصلب الذى لا يصدأ ملفوفة داخل الزجاجة و يمر خلالها ماء بارد من مصدر خارجى لاعطاء مصدر مستمر من الماء البارد .



شكل (٤٣) تنقية غاز الازوت قبل مروره فى زجاجة النتهيدرين

١٠- مضخة النتهيدرين

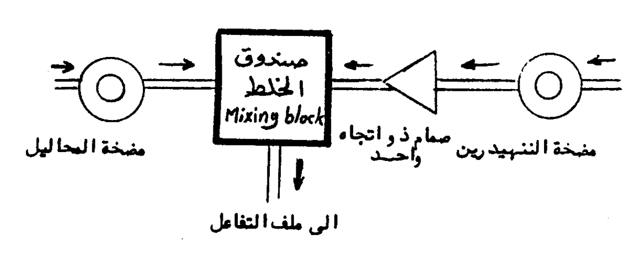
NINHYDRIN PUMP

تعمل على سحب محلول النتهيد رين من زجاجة النتهيد رين و تضخه بانتظام الى صندوق الخلط لخلطه مع تيار المنظم المحتوى على العينة موزعة كاحماض امينية منفردة ، و هى تشبه مضخة المنظم السابق ذكرها ، و يوجد بعدها صمام يسمح بمرور النتهيد رين الى صندوق الخلط و لا يسمح برجوع المحلول فى الاتجاه العكسى .

١١- صندوق الخلط

Mixing block

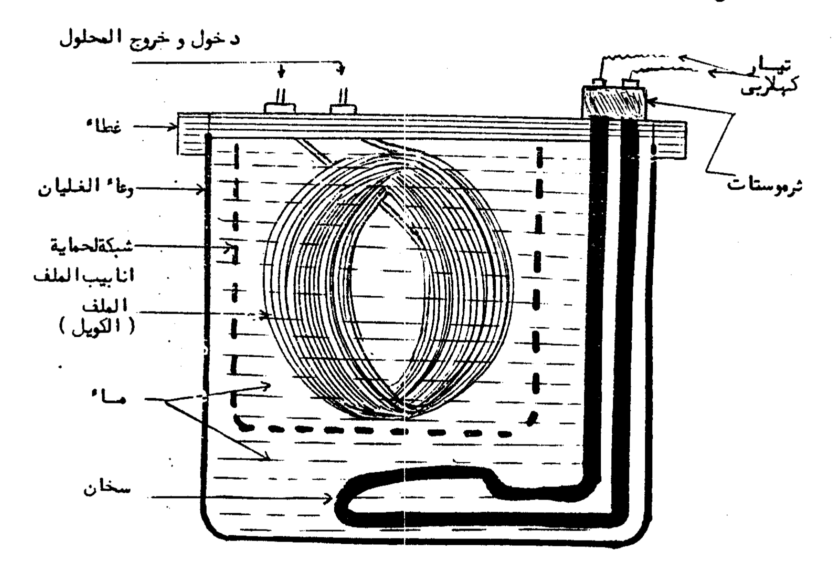
علبة شكل (٤٤) لخلط النتهيد رين القادم من مضخة النتهيد رين و الصمام ذو الاتجاه الواحد و محلول المنظم الحامل للاحماض الامينية القادم من عمود الفصل و يخرج تيار واحد مشترك الى ملف التفاعل



شكل (٤٤) صندوق الخلط

١٢- ملف التفاعل Reaction bath

يحتاج تفاعل النتهيدرين مع الاحماض الامينية و تكون اللون المميز له الى درجة حرارة مرتفعة حوالى ١٠٠ مل لمدة مناسبة ، و يتم ذلك من خلال امرار المخلوط من المحلول المنظم الحامل للاحماض الامينية و النتهيدرين فى انبوبة طويلة ضيقة ملتفة طولها حوالى ٦٠ مترا ؛ بحيث يحتاج المحلول للمرور فيها الى ما بين ١٠ – ١٧ دقيقة و هى كافية لظهور اللون ، و هذه الانبوبة الطويلة الضيقة و تسمى (الكويل Coil) موضوعة فى اناء به ماء يغلى بواسطة سخان كهربى مركب على اناء الماء الذى يغلى مكثف بحيث لا يفقد الماء بالغليان شكل (٤٥) .

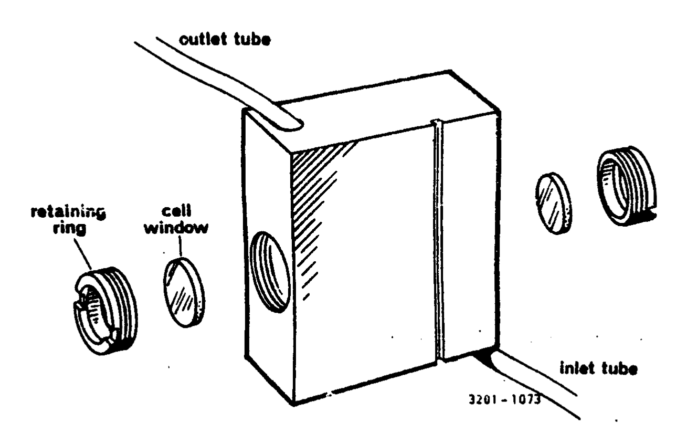


شكل (٤٥) ملف التفاعل (الكويل) و دورة الغليان المائية .

١٣- الفوتوميتر

PHOTOMETER

ويتكون من ٣ وحدات قياس ضوئى لكل منها خلية عينة خاصة يمر فيها المحلول من فتحة ويخرج من فتحة وبها ثلاث خلايا ضوئية من السليكا شكل (٤٦) الاولى تقيس عند طول موجى ٥٧٠ نانومتر ومساحة مرور الضوء فى المحلول ١٠ مم والثانية مثل الاولى ولكن مساحة مرور الضوء ٥ مم وهما يقيسان اللون الازرق البنفسجى اما الثالثة فلقياس الطول الموجى ٤٤٠ نانومتر ذو اللون البنى المصفر ومساحة مرور الضوء فيها ١٠ مم ٠



شكل (٤٦) احد وحدات القياس الضوئى

١٤- المسجل RECORDER

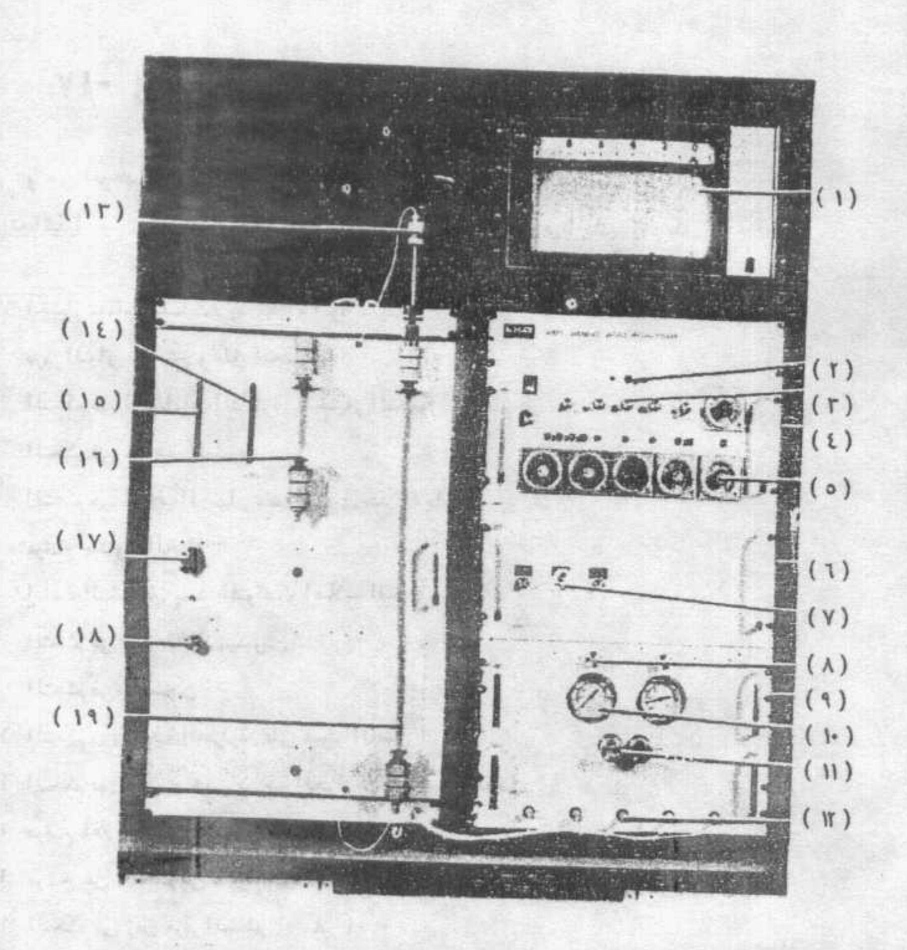
يسجل بثلاث نظم بثلاث الوان من الحبر لثلاث اقلام (احمر واخضر واسود) يرسم على اسطوانة من الورق المقسم لوغاريتميا ، و يمكن التحكم فى ضبطه يدويــا او من وحدة البرمجة .

١٥- منظم المسحات على المسجل INTEGRATOR

و هو متصل بوحدة البرمجة و يمكن من خلاله ضبط سرعة المسجل او المساحة التى يمثلها مربع ورق التسجيل .

١٦- دورة المياة الساخنة CIRCULATION BATH

شبكة من الانابيب تحمل الماء من سخان الغليان الذى يغلى فيه الكويل الى وحدة ضبط درجة الحرارة حسب اشارة تأتى من وحدة البرمجة لترسل الماء على درجة حرارة معينة الى جاكت عمود الفصل ، و يتم ضبط درجة حرارته برفعها عن طريق سحب ماء ساخن من الماء المغلى فى الكويل او بارد من دورة المــاء البارد المستخدم فى تبريد النتهيدرين .



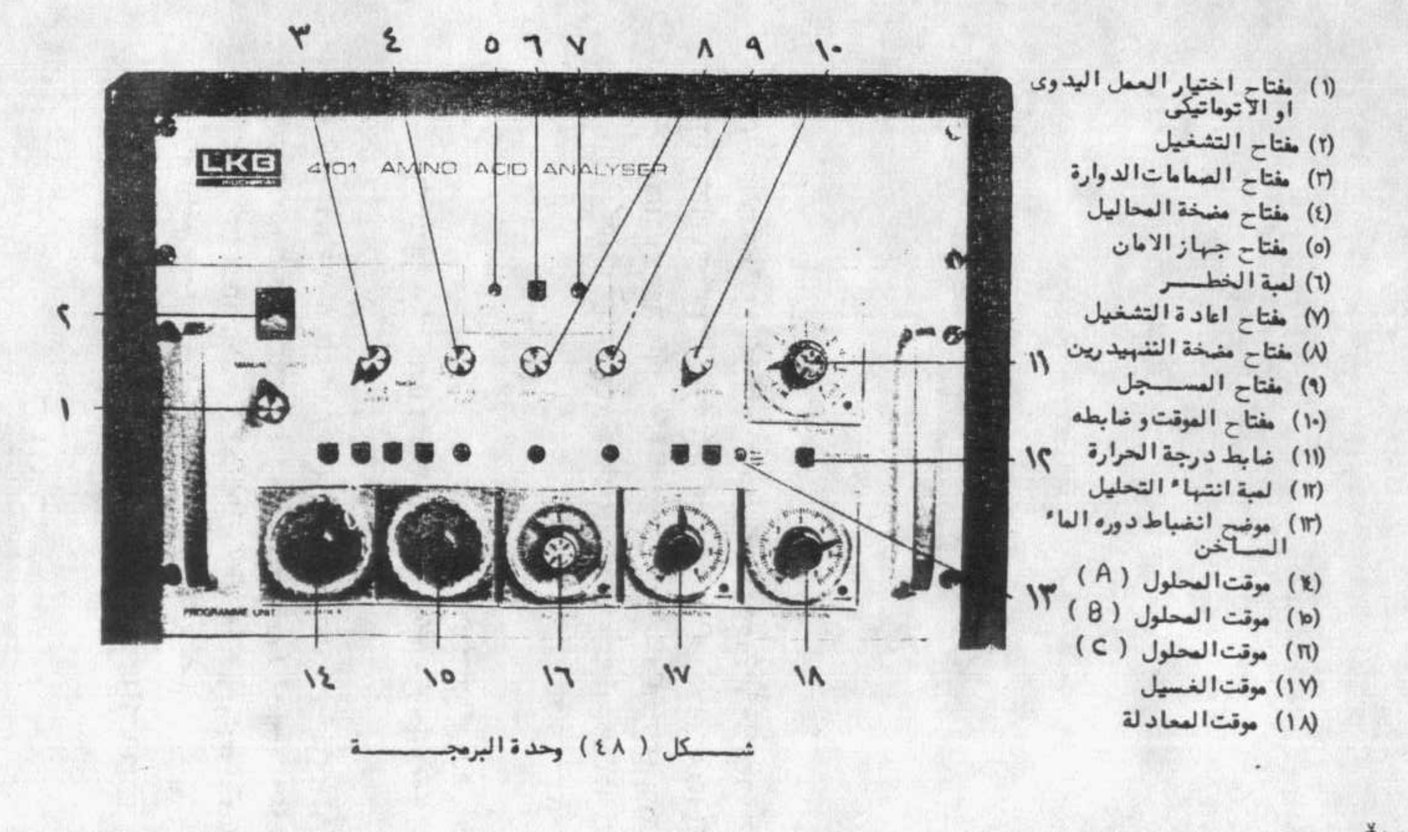
شكل (٤٧) صورة عامة لجهاز الفصل الاتوماتيكى للاحماض الامينية (AAA)

(١) المسجل
(٢) موضع الامان
(٣) مفاتيح الضبط
(٤) وحدة البرمجة
(٥) الموقتات
(٦) وحدة القياس الضوئى
(٧) ضابط خط البداية
(٨) ضابط الصمام
(٩) وحدة المضخات
(١٠) عداد الضغط
(١١) المضخات
(١٢) انابيب التوصيل
(١٣) ضابط حراره العمود
(١٤) ترمومتر
(١٥) مبين التدفق
(١٦) العمود القصير
(١٧) صمام حقن العينة
(١٨) صمام (١٩) العمود الطويل

١٧- وحدة البرمجة PROGRAMME UNIT

و هى الوحدة المهيمنة على جميع اجزاء النظام التحليلى و تعمل اما يدويا او اتوماتيكيا و يتم من خلالها عن طريق مفاتيح خاصة التحكم فيما يلى : شكل

١ اختيار نظام العمل (يدويا او اتوماتيكيا)
٢ مرور التيار (فتح و غلق الجهاز)
٣ التحكم فى الصمامات الدوارة لاختيار المحلول المنظم
٤ التحكم فى مضخة المنظم
٥ التحكم فى ايقاف الجهاز عند تعدى حد الامان
٦ موضح حدوث الخطأ
٧ اعادة التشغيل بعد التوقف و اصلاح الخطأ
٨ التحكم فى مضخة النفهيدرين
٩ التحكم فى المسجل
١٠ التحكم فى درجة الحرارة على عمود الفصل
١١ التحكم فى توقيت تغيير درجة الحرارة على عمود الفصل
١٢ موضح اعلان انتهاء تقدير العينة
١٣ موضح عن التحكم فى دورة المياة الساخنة
١٤ التحكم فى زمن مرور المنظم (A)
١٥ " " " " (B)
١٦ " " " " (C)
١٧ " " " محلول الغسيل (NaOH)
١٨ " " " المنظم (A) مرة اخرى لمعادلة العمود



(١) مفتاح اختيار العمل اليدوى او الاتوماتيكى
(٢) مفتاح التشغيل
(٣) مفتاح الصمامات الدوارة
(٤) مفتاح مضخة المحاليل
(٥) مفتاح جهاز الامان
(٦) لمبة الخطـــر
(٧) مفتاح اعادة التشغيل
(٨) مفتاح مضخة النتهيدرين
(٩) مفتاح المســـجل
(١٠) مفتاح الموقت و ضابطه
(١١) ضابط درجة الحرارة
(١٢) لمبة انتهاء التحليل
(١٣) موضح انضباط دوره الماء الساخن
(١٤) موقت المحلول (A)
(١٥) موقت المحلول (B)
(١٦) موقت المحلول (C)
(١٧) موقت الغسيل
(١٨) موقت المعادلة

شـــكل (٤٨) وحدة البرمجـــة

فى حالة عمل الجهاز يدويا : جميع عمليات الجهاز يمكن التحكم فيها عن طريق مفاتيحها مباشرة و فى حالة عمل الجهاز اتوماتيكيا ، ينضبط الجهاز على البرنامج و تدار المفاتيح على وضع الاتوماتيك و فى هذه الحالة لا يمكن التحكم اليدوى فى المفاتيح و لكنها تعمل تلقائيا و تفقد المفاتيح برمجتها الا بعد انتهاء تحليل العينة و ظهور الضوء فى الموضح (١٢) للدلالة على انتهاء التحليل .

ووحدة التحكم و البرمجة ايضا تؤدى وظيفة الامان حيث يتوقف الجهاز و تظهر علامة على موضح الخطـر فى حالة :

١ ـ اذا حدث خلل فى سخان الكويل
٢ ـ اذا زادت او قلت درجة حرارة العمود عن الحد الموضح فى المبرمج
٣ ـ اذا حدث خلل فى ثرموستات التحكم فى درجة حرارة ضابط حرارة الماء
٤ ـ اذا حدث خلل فى المصدر الضوئى للفوتوميتر (لمبات وحدات القياس الضوئى)
٥ ـ تلف اى جزء من النظام الشبكى للانابيب بحيث يقل معدل التدفق اثناء العمل .

رابعا : ضبط وتشغيل واجراءات التحليل على الجهاز.

اعداد الجهاز

OPERATION

اولا : قبل فتح الجهاز على (ON) يراعى ما يلى :

(١) يوضع مفتاح المضخة (مضخة المنظم و النتهيدرين) و المسجل على وضع (OFF)

(٢) يوضع مفتاح الخطر على وضع (OVERRIDE)

(٣) يوصل مصدر الماء البارد بالجهاز و يلاحظ كفاءة عمله بحيث يكون معدل مروره فى الجهاز ما بين ٢ر — ٤ر٠ لتر / الدقيقة

(٤) توصل وصلات الاخراج الى مصدر صرف خارجى

(٥) يملىء وعاء ماء الكويل ووعاء ضبط تحكم درجة الحرارة

(٦) توصل جميع الوصلات فى موضعها الصحيح

(٧) توصل لمبات الفوتوميتر بالمصدر الضوئى

ثانيا : يفتح مفتاح (ON) و يلاحظ ان :

(١) سخان الماء فى وعاء الكويل يعمل

(٢) ضابط حرارة تيار الماء فى العمود يعمل

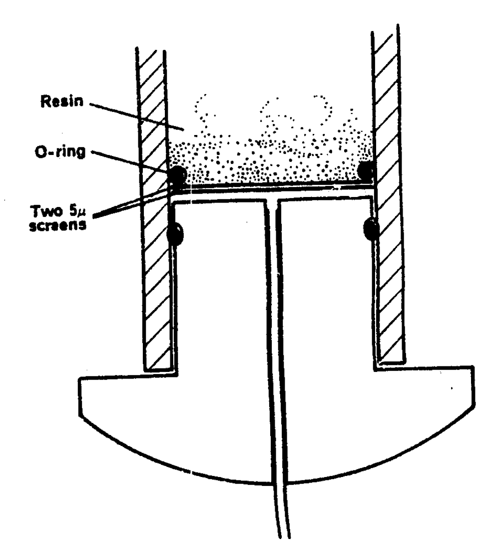
③ مصابيح (لمبات) الفوتوميتر اضيئت

④ يلاحظ ان دورة الماء فى جاكت عمود الفصل تحتوى على فقاقيع او تكون مليئة بالهواء فى بداية التشغيل ، و لذلك يجب التخلص منه بفصل وصلة الانبوبة القادمة من العمود عند اتصالها بالترمومتر و تدلى الى اسفل حتى يتم التخلص من الفقاقيع ثم تركب مكانها .

ثالثا : تملأ زجاجات المحاليل بالمحاليل

رابعا : يملأ عمود غسيل الامونيا بالراتنج مع ترك حوالى ٣ سم فى اعلاه فارغا ليعمل كمصيدة للفقاقيع .

توضع شبكة من الحديد الذى لا يصدأ قطر فتحاتها ٥ ميكرون ثم حلقة دائرية فى طرف العمود ثم توضع الراتنج كما هو موضح فى شكل (٤٩)



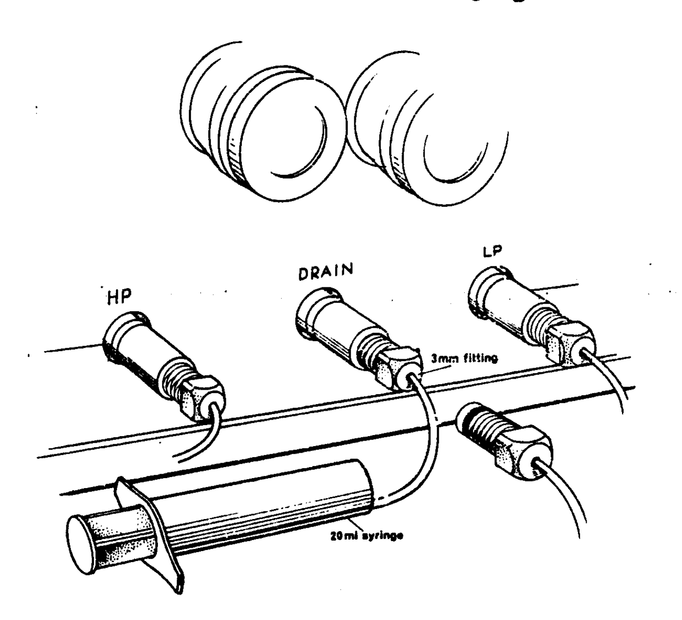
شكل (٤٩) الجزء السفلى من عمود غسيل الامونيا و اجزاء المرشح

خامسا : تضبط مصايد الفقاقيع عن طريق سحب او ضغط السرنجات المركبة فيها بحيث يكون حجم الهواء فيها حوالى ٢ سم ٠

سادسا : يلاحظ ان المضخات لا تعمل اذا كان هناك اى فقاقيع او هواء فى صمامات المضخة و يجب التخلص من هذا الهواء كالاتى :

آ ـ يوضع مفتاح صمام المحلول المنظم على وضع (Drain) يختار المنظم و تشغل المضخة

ب ـ تركب سرنجة ٢٠ مل على الانبوبة المؤدية الى الصرف الخارجى و اسحب كما فى شكل -٥



شكل (٥٠) طريقة سحب الهواء و الفقاقيع من المضخات و شبكة انابيب الجهاز

جـ - استمر في السحب حتى تفرغ المضخة تماما من الهواء

د - ادر مفتاح الصمام الى وضع (Column)

هـ - اسحب بالسرنجة حتى تتخلص من الفقاقيع التى قد تكون موجودة فيه

و - تأكد من سلامة تشغيل المضخة . وكرر ذلك مع مضخة النتهيدرين .

سابعا : ضبط معدل تدفق تيار المحلول المنظم و النتهيدرين و يجب ان يكون كنسبة ٢ : ١ ، و يجب الا يزيد الضغط عن ٣٥ ضغط جوى و يجب ان يظل معدل التدفق و الضغط ثابتين طوال فترة التحليل و يتم قياس معدل التدفق كالاتى :

١ - ادر رمة مقياس التدفق (flow meter) الى وضع (OFF) فيمر المحلول الى سحاحة القياس ، و بواسطة ساعة ايقاف احسب الوقت اللازم لتحرك المحلول من الصفر الى علامة ٢ مل على السحاحة ، ثم ادر قمة قياس التدفق الى العمل ليصل المحلول الى الصرف.

٢ - اعد ذلك ثلاث مرات ، و خذ المتوسط ، و احسب معدل التدفق مل / دقيقة

٣ - اعد نفس العمل السابق مع مضخة النتهيدرين ، و احسب معدل التدفق يحسب معدل تدفق النتهيدرين عند تشغيل المضختين معا ، و حساب الفرق بين معدل التدفق الكلى و معدل تدفق المحلول المنظـــم و يطرح منـــه .

ثامنا : يملأ وعاء الكويل بالماء المقطر و يلاحظ مستوى الماء فيه و يزود بالماء المقطـر كلما احتاج الامر

تاسعا : يملأ وعاء ضابط حرارة ماء جاكت العمود الى ثلثة بالماء المقطـر

عاشرا : يضبط جهاز الامان لدرجة الحرارة (T_1) ، (T_2) على مدى اعلى و اقل من الدرجة المطلوبة بخمس درجات بمعنى اذا كانت الدرجة (T_1) ، (T_2) ٣٠°م ، ٥٥°م يضبط جهاز الامان عـــلى ٢٥°م — ٦٠°م ٠

حادى عشر : ضبط جهاز التبريد و التأكد من عمل صمامة ذو الوصلتين

ثانى عشر : ملاحظة المصادر الضوئية للفوتوميتر ، و اذا كانت واحدة منها ضعيفة الاضاءة فيمكن تغييرها ٠

التشغيل واجراء التحليل THE RUN

الملاحظات السابقة للعمل :
===============

١ مستوى الماء المقطر فى وعاء الكويل
٢ مستوى الماء المقطر فى ضابط درجة حرارة جاكت عمود الفصل
٣ مستوى المحاليل المنظمة و ايدروكسيد الصوديوم
٤ مستوى محلول النتهيدرين
٥ مستوى مصايد الفقاقيع
٦ مستوى الماء فى زجاجة الصرف
٧ مستوى الراتنج فى عمود الفصل
٨ مســتوى غاز الازوت فى الاسطوانة ، و معدل تيار الغاز
٩ درجة حرارة العمود
١٠ معدل تدفق الماء البارد
١١ الورق على المســجل

العمليات الاتوماتيكية فى وحدة البرمجة

AUTOMATIC OPERATION OF THE PROGRAMMER

مفتاح نظام العمل على وضع اوتو (Auto)
يبدأ موقت المنظم (A) و موقت تغيير درجة الحرارة ، و تعمل مضخة المنظم و مضخة النتهيدرين و يعمل المسجل و يفتح صمام المنظم (A) ،
و عندما يصل وقت موقت المنظم (A) الى الصفر يبدأ موقت المنظم (B) فى العمل و عندها يغلق صمام المنظم (A) و يفتح صمام (B) ، وعندما يصل موقت (B) الى صفر يبدأ موقت المنظم (C) فى العمل و يغلق صمام المنظم (B) و يفتح صمام المنظم (C) وعندما يصل موقت المنظم (C) الى الصفر يبدأ موقت محلول الغسيل فى العمل و يغلق صمام المنظم (C) و يفتح صمام ايدروكسيد الصوديوم و عندما تتم عملية الغسيل يبدأ موقت محلول المعادلة فى العمل و عند هذا الوقت تتوقف مضخة النتهيدرين و المسجل و تستمر مضخة المنظم فقط فى العمل ، و عندما يصل موقت محلول المعادلة الى الصفر يكون التحليل قد اكتمل و تتوقف مضخة المنظم و يقفل صمام (A) و تضئ لمبة موضح انتهاء العمل .
و الجدول ١٩ يوضح ملخص العمل السابق .

جـدول (١٩) .

BUFFER	A		B	C	NaOH	A
NINHYDRIN	ON					
RECORDER	ON					
TEMPERATURE	T_1 = 29°C	T_2 = 56°C				T_1 = 29°C
TIME (mins.)	65	40	40	150	20	45

حقن العينة

SAMPLE LOADING

١ يوضع المبرمج على نوع نظام التحليل
٢ يدار صمام حمل العينة على وضع (Load)
٣ يوضع حجم ٢ مل فى سرنجة من محلول العينة
٤ يحقن المحلول و يتلقى الفائض فى كأس
٥ يبدأ عمل التحليل الاتوماتيكى
٦ يدار صمام الحمل الى وضع (Inject) و ينتظر حتى يبدأ عداد ضغط المنظم و التنهيدرين فى العمل الطبيعى ، و تصل بلية معدل التدفق و الضغط الى اعلى .
٧ بعد ١٥ دقيقة يلاحظ خط البداية (Baseline) على المسجل
٨ يضبط خط البداية على المسجل الى قرب نهاية طرف الورقة

----

ffffffffff

خامسا : تقييم منحنيات التحليل.

PEAK EVALUATION

ينتهى التحليل بالنسبة لمخلوط التعيير او العينات الى رسم منحنيات على ورق التسجيل كما فى شكل (٥٢)و(٥٣) .

و تحسب المساحة تحت المنحنى فى المحلول القياسى و تحسب للتركيزات المقابلة لوحدة المساحة ، و يكرر ذلك مع العينات و منها يعرف تركيز الاحماض الامينية فى العينـــات .

و يعتبر البيك (المنحنى) قريب جدا من مساحة المثلث فى مساحته و هى تساوى ((الارتفاع × القاعدة المتوسطة)) و القاعدة المتوسطة هى طول الخط الموازى للقاعدة الواصل بين ضلعى المثلث على بعد يساوى $\frac{1}{2}$ العمود الساقط من راس المثلث الى الضلع الثالث ، و على ذلك تكون مساحة المثلث تحت البيك :

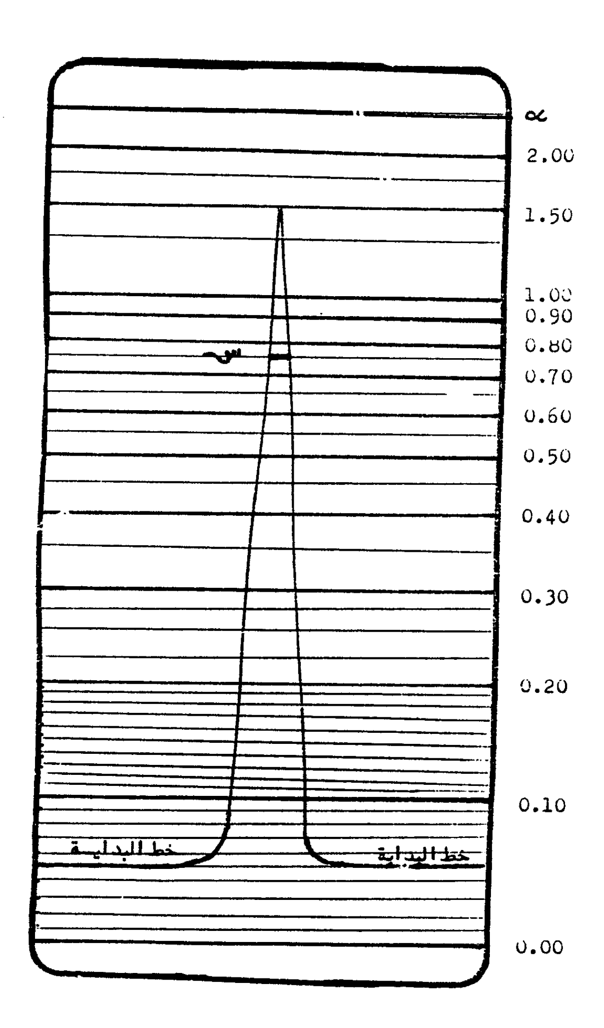
مـــس = ع × س .... (١)

حيث : مـــس = المساحة المحصورة تحت البيك

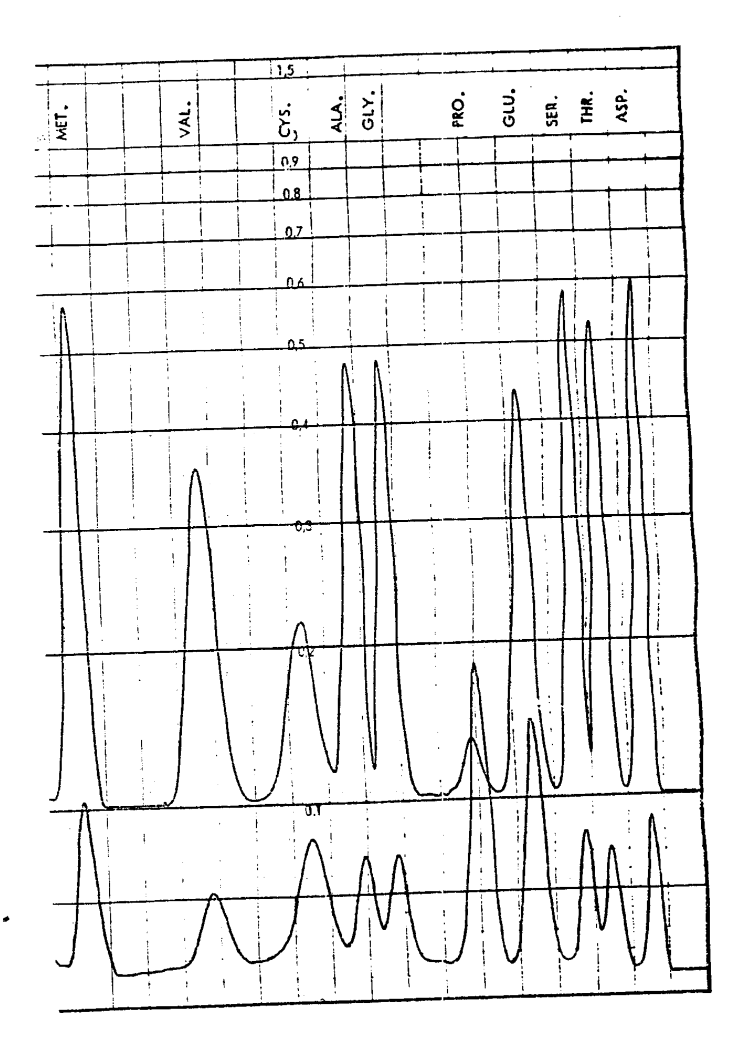
ع = ارتفاع البيك عن القاعدة

س = القاعدة المتوســـــطة

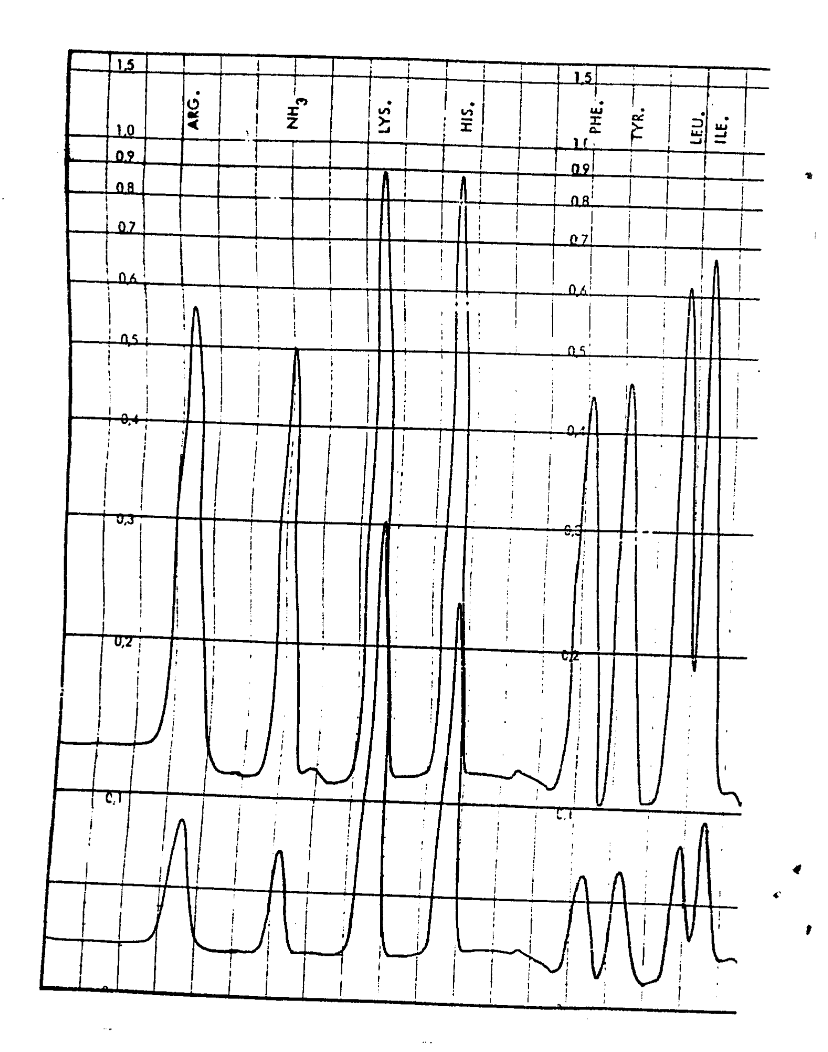
و فى حالة الورق البيانى اللورغاريتمى يصعب اخذ هذه البيانات بالمسطرة (او بمعنى اخر بالتدريج المترى العادى) و انما يجب حسابها من التدريجات اللوغاريتمية المبينة على الورق البيانى المعد لهذا الغرض ، و على ذلك تحســب كل من ع ، س فى المعادلة (١) السابقة كما فى شكل (٥١) كالاتى :



شـكل (٥١) منحنى حمض امينى على المسجل .
مرسوما على ورق مقسم لوغاريتميـــا

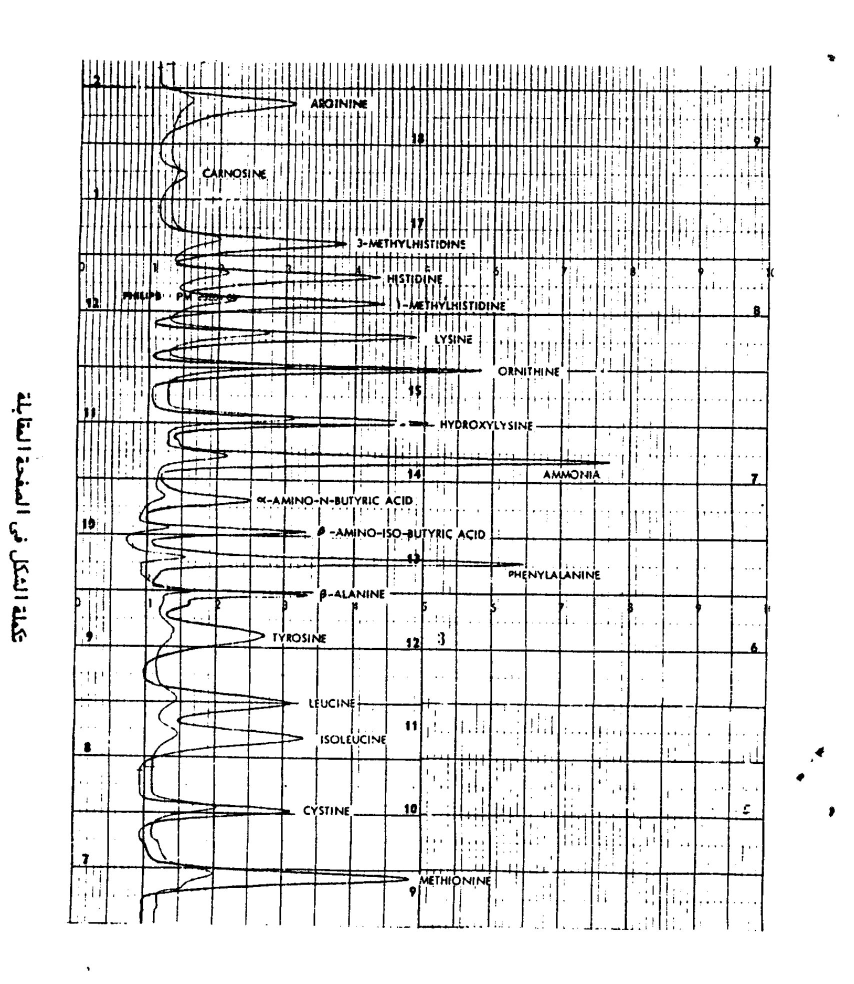


شكل (٥٢) المنحنيات القياسية للاحماض الامينية فى بروتين مهضوم قياسى على جهاز (A A A) بنظام الصوديوم الثلاثى
٢٥ نانومول من كل حمض



تكملة الشكل فى الصفحة المقابلة

شكل (٥٣) المنحنيات القياسية للاحماض الامينية فى محلول سائل فسيولوجى قياســــى على جهاز (AAA)



تكملة الشكل في الصفحة المقابلة

١ - يقرأ التدريج اللوغاريتمى الذى يقع عليه خط البداية
(الخط القاعدى) .... (ب)

٢ - يقرأ التدريج اللوغاريتمى الذى يقع عليه قمة البيك ..... (ق)

٣ - ع = ق - ب .... (٢)

٤ - يحسب نصف الارتفاع .... ($\frac{ع}{٢}$)

٥ - يحدد منسوب القاعدة المتوسطة .... (ن)

٦ - تحسب ن كالاتى ن = $\frac{ع}{٢}$ + ب .... (٣)

٧ - تقاس المسافة الافقية بين مصراعى البيك عند المنسوب
ن بالقياس المترى العادى .... (س)

٨ - تحسب المساحة تحت المنحنى (مس) من المعادلة
رقم (١) .

مثـــــال :

احسب المساحة تحت المنحنى للبيك الموضح فى شكل (٥١)

الحل :

ب = ٠٫٠٥

ق = ١٫٥٠

ع = ق - ب = ١٫٥٠ - ٠٫٠٥ = ١٫٤٥

$\frac{ع}{٢}$ = $\frac{١٫٤٥}{٢}$ = ٠٫٧٢٥

ن = $\frac{ع}{٢}$ + ب = ٠٫٧٢٥ + ٠٫٠٥ = ٠٫٧٧٥

تقاس المسافة المترية عند المنسوب ٠٫٧٧٥ لوغاريتمى س = ٠٫٣

مـس = ع × س = ١٫٤٥ × ٠٫٣ = ٠٫٤٣٥

تقدير معامل التعبير

يمثل كل بيك فى المنحنى مركبا معينا معلوم التركيز فى المحلول القياسى ، وبعد حساب المساحة تحت كل بيك فى المنحنى القياسى تعبر هذه المســـاحة منسوبة للتركيز القياسى للمادة المعايرة (عينة التعبير) حيث :

$$\text{عـت}_{\text{أ}} = \frac{\text{ت}_{\text{أق}}}{\text{مـس}_{\text{أق}}}$$

حيث : عـت أ هو معامل التعبير للحمض الامينى أ

ت أق هو تركيز الحمض الامينى أ فى المحلول القياسى

مـس أق هو المساحة تحت البيك أ من المنحنى القياسى

وعادة يكون تركيز كل حمض امينى ٢٥ نانو مول فى المحلول القياسى

$$\text{ت}_{\text{أق}} = \frac{٢٥ \times \text{م أ}}{١٠٠٠} \text{ ميكروجرام} = \frac{\text{م أ}}{٤٠} \text{ ميكروجرام}$$

حيث م أ هو الوزن الجزيئى الجرامى للحمض الامينى أ

اذن من المعادلة (٤) يكون $\text{عـت}_{\text{أ}} = \frac{\text{م أ}}{٤٠ \times \text{مـس}_{\text{أق}}}$

مثال في المثال السابق اذا كان هذا البيك المرسوم في شكل (٥٦) هو بيك حمض الاسبارتيك وزنة الجزيئي ١٣٢ جرام احسب معامل التعبير له .

الحل : عـت = ١٣٢ / (٤٠ × ٠٫٤٢٥) = ٧٫٥٨٦ ميكروجرام

حساب تركيز الحمض في العينة :

تحسب مساحة المنحنى الخاص بذات الحمض في منحنى قياس العينة على الجهاز وذلك بنفس الطريقة السابق شرحها مع المحلول القياسي ، ثم تضرب في معامل التعبير اى ان

كمية الحمض في العينة المحقونة (١ مل) = مـسـ$_{ع}$ × عـت ميكروجرام/مل

مثال : في المثال السابق احسب كمية حمض الاسبارتيك في عينة مساحة منحنى حمض الاسبارتيك فيها = ٠٫٦٣ ونسبة البروتين في مهضوم العينة ٥ ملجم لكل ١٠٠ مل من المهضوم .

الحل : تركيز الاسبارتيك في العينة = ٠٫٦٣ × ٧٫٥٨٦

= ٤٫٧٨ ميكروجرام / مل

= (٤٫٧٨ × ١٠٠) / (١٠٠٠ × ٥) × ١٠٠ = ٩٫٥٦ ٪

مراجع الفصل الخامس

Stein & Moore:

J.Biol. Chem.; 176: 337 (1948)

J.Biol. Chem.; 190 : 107 (1951)

J.Biol.Chem. ; 211 : 893 (1954)

J.Biol. Chem.; 211 : 907 (1954)

Spackman, Stein & Moore: Anal.Chem. 30: 1190(1958)

$$$$$$$$$$$$$$$$
$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$$
$$$$$

الفهرس

الموضــــــــوع	الصفحة

رقم الايداع بدار الكتب و الوثائق القوميـة

١٩٩٠ / ٨٤١٣

الناشر : دار الهدى للتأليف و النشر و التوزيع - القاهرة